

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

«ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ»

**«Ακτινογραφική και στοιχειομετρική μελέτη σπονδύλων
εκτρεφόμενων *Sparus aurata* με την σκελετική δυσμορφία της
σκολίωσης»**

Μπουρσιάκη Βάια

ΒΟΛΟΣ 2018

«Ακτινογραφική και στοιχειομετρική μελέτη σπονδύλων εκτρεφόμενων *Sparus aurata* με την σκελετική δυσμορφία της σκολίωσης»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1) **Παναγιώτης Βερίλλης**, Επίκουρος Καθηγητής, Μικροσκοπία και Ανάλυση Εικόνας στην Ιστολογία και στους Υδρόβιους Οργανισμούς, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.

2) **Στέφανος Ζαούτσος**, Καθηγητής, Αντοχή Υλικών, Τμήμα Μηχανολόγων Μηχανικών Τ.Ε, ΤΕΙ Θεσσαλίας, **Μέλος**

3) **Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης**, Επίκουρος Καθηγητής, Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**

Στον αδερφό μου

Στάθη

Και στους γονείς μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Π. Βερίλλη για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους κ. Ι. Καραπαναγιωτίδη και κ. Σ. Ζαούτσο για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τσιπούρα αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εκτρεφόμενα είδη της Μεσογείου. Ωστόσο, οι σκελετικές παραμορφώσεις όπως η σκελετική δυσμορφία της σκολίωσης επιφέρουν αρνητικές επιπτώσεις στην παραγωγή καθώς επηρεάζουν την ανάπτυξη και την επιβίωση του ψαριού. Στην παρούσα εργασία συλλέχθηκαν από μονάδα υδατοκαλλιέργειας 20 άτομα τσιπούρας και χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιελάμβανε άτομα χωρίς σκελετικές παραμορφώσεις, ενώ η δεύτερη ομάδα περιελάμβανε άτομα με την σκελετική δυσμορφία της σκολίωσης. Μετρήθηκε το ολικό μήκος και το βάρος όλων των ατόμων και κατόπιν ακτινογραφήθηκαν. Η σπονδυλική στήλη όλων των ατόμων χωρίστηκε σε τρεις περιοχές: την αυχενική, την ραχιαία και την ουραία περιοχή. Έπειτα, μετρήθηκε και συγκρίθηκε το μήκος των σπονδύλων μεταξύ της κάθε περιοχή της σπονδυλικής στήλης ανάμεσα στα φυσιολογικά και στα σκελετικά δύσμορφα άτομα. Οι διαφορές μεταξύ της απόστασης των σπονδύλων δεν ήταν σημαντικές ανάμεσα στις δύο ομάδες ατόμων. Επιπλέον, μετρήθηκαν τα ποσοστά του ανόργανου και του οργανικού υλικού των οστών. Εν συνεχεία με την μέθοδο EDS προσδιορίστηκε το ποσοστό του κάθε ανόργανου στοιχείου των οστών. Τα ποσοστά τόσο του οργανικού όσο και του ανόργανου υλικού δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των φυσιολογικών και των σκολιωμένων ατόμων. Τέλος, τα ποσοστά των Ca, P, Na, Mg, Cl, Ir, Cu δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στις δύο ομάδες των ιχθύων. Αντίθετα το ποσοστό του καλίου διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των φυσιολογικών και των σκολιωμένων ατόμων.

Λέξεις κλειδιά: τσιπούρα, σκολίωση, EDS, οργανικό υλικό, ανόργανο υλικό

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	σελ 8
1.1 Σκελετικές δυσμορφίες.....	σελ 8
1.2 Οστίτης ιστός.....	σελ 11
1.3 Παράγοντες στους οποίους οφείλονται οι σκελετικές δυσμορφίες ..	σελ 13
1.3.1 Διατροφικοί παράγοντες.....	σελ 14
1.3.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	σελ 16
1.3.3 Γενετικοί παράγοντες.....	σελ 17
1.4 Η σκελετική δυσμορφία της σκολίωσης.....	σελ 18
1.5 Σκοπός.....	σελ 19
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	σελ 20
2.1 Συλλογή και μέτρηση δειγμάτων.....	σελ 20
2.2 Μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης.....	σελ 23
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	σελ 26
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	σελ 43
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	σελ 52
6. ABSTRACT	σελ 63

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σκελετικές δυσμορφίες

Η τσιπούρα *Sparus aurata* (Linnaeus 1758) αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εκτρεφόμενα είδη της Μεσογείου καθώς η συνολική παραγωγή της τσιπούρας ανέρχεται στους 104.594 τόνους ετησίως (FMG 2017). Είναι ένα ευρύαλο και ευρύθερμο, πελαγικό είδος και συναντάται κυρίως σε αμμώδεις πυθμένες και στα λιβάδια της Ποσειδωνίας. Ανήκει στην τάξη των περκόμορφων και στην οικογένεια των Σπαρίδων. Η αναπαραγωγή της λαμβάνει χώρα από τον Οκτώβριο έως και τον Νοέμβριο και εμφανίζει πρωτανδρικό ερμαφροδιτιδμό. Επιπλέον, εγκλιματίζεται εύκολα σε συνθήκες αιχμαλωσίας, αναπτύσσεται με γρήγορους ρυθμούς και προσαρμόζεται σε πιθανές μεταβολές των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού, με αποτέλεσμα να είναι ένα από τα κυριότερα εκτρεφόμενα είδη της Μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας (Georgakopoulou *et al* 2010).

Ωστόσο, οι σκελετικές δυσπλασίες επιφέρουν αρνητικές επιπτώσεις στην παραγωγή καθώς επηρεάζουν την ανάπτυξη και την επιβίωση του ψαριού. Οι παράγοντες στους οποίους οφείλονται οι σκελετικές αυτές δυσμορφίες δεν είναι ακόμα κατανοητές και δεν έχει μελετηθεί η ακριβής αιτία που τις προκαλεί. Σύμφωνα με μελέτες σχετίζονται με περιβαλλοντικούς, διατροφικούς και γενετικούς παράγοντες (Andrades *et al* 1995).

Οι σκελετικές παραμορφώσεις περιλαμβάνουν την κύφωση, την λόρδωση, την σκολίωση, την πλατυσπονδύλωση, την συγχώνευση σπονδύλων και άλλων ειδών παραμορφώσεων όπως συμπιεσμένο ρύγχος, κάμψη της γνάθου, λαγοχειλία ή προεξέχουσα γνάθος, μη καλά αναπτυγμένη κάτω γνάθος, μη καλά αναπτυγμένο

βραγχιοκάλυμα, μικρά ή ασύμμετρα πτερύγια, κλπ (Divanach *et al* 1996).

Σύμφωνα με τους Fernandez *et al.* (2008), οι σκελετικές παραμορφώσεις έχουν σημαντικές επιπτώσεις καθώς επηρεάζουν έως και το 30% της παραγωγής, ενώ σύμφωνα με τον Koumoundouros (2010) οι σκελετικές παραμορφώσεις την τελευταία δεκαετία αντιπροσωπεύουν έως και το 20% της συνολικής ετήσιας παραγωγής στην βιομηχανία των υδατοκαλλιεργειών. Επιπλέον, έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, την αύξηση της θνησιμότητας και επηρεάζουν το κόστος παραγωγής εφόσον το προϊόν δεν διατίθεται στην αγορά αφού δεν είναι αποδεκτό από τους καταναλωτές (Divanach *et al* 1996). Οι απώλειες αυτές είναι ουσιώδεις για τις επιχειρήσεις των ιχθυοκαλλιεργειών όσον αφορά την παραγωγικότητα και το κέρδος, καθώς οι σκελετικές δυσμορφίες επηρεάζουν έως και το 30% της συνολικής παραγωγής (Fernandez *et al* 2008). Το 15-50% των νεαρών ατόμων της τσιπούρας που εμφανίζουν σκελετική παραμόρφωση αποσύρονται από την παραγωγή στο τέλος της φάσης της εκκόλαψης (Boglione & Costa 2011). Οι σκελετικές δυσμορφίες καθώς και οι επιπτώσεις αυτών, είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν το κόστος παραγωγής των εκτροφείων εφόσον καθορίζουν την εξωτερική μορφολογία, την ανάπτυξη και τα ποσοστά επιβίωσης των ιχθύων (Matsuato 1986, Divanach *et al* 1997, Koumoundouros *et al* 2002). Σύμφωνα με τους Boglione *et al.* (2001) μόνο το 4% των άγριων συλληφθέντων ατόμων εμφανίζουν σκελετικές δυσπλασίες. Αντίθετα, το ποσοστό αυτό μπορεί να φθάσει σε πολύ υψηλά επίπεδα στα εκκολαπτήρια (Divanach *et al* 1996).

Ο υψηλός ανταγωνισμός μεταξύ των μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας και η μείωση της τιμής της τσιπούρας στην αγορά εξαιτίας των μεγάλων ποσοτήτων παραγωγής τα τελευταία χρόνια, οδήγησαν τις βιομηχανίες των ιχθυοκαλλιεργειών να μειώσουν το

κόστος παραγωγής και να βελτιώσουν τα ποσοστά μεταμόρφωσης των νυμφών (Fernandez *et al* 2008).

Στις ιχθυοκαλλιέργειες οι απώλειες οι οποίες οφείλονται στις δυσμορφίες λαμβάνουν χώρα σε δύο επίπεδα: στα εκκολαπτήρια, μειώνοντας το ποσοστό επιβίωσης των εκκαλαφθέντων προνυμφών και το ρυθμό ανάπτυξης τους και στα εκτροφεία των ενήλικων ατόμων τα οποία έχουν αποκτήσει το κατάλληλο εμπορικό μέγεθος. Στην δεύτερη περίπτωση, όπου τα ψάρια έχουν φθάσει στο κατάλληλο εμπορικό μέγεθος αλλά παρουσιάζουν σκελετικές δυσμορφίες, τα άτομα είτε απορρίπτονται από την αγορά είτε πωλούνται σε χαμηλότερες τιμές από τις συνήθεις τιμές της αγοράς τους.

Οι σκελετικές δυσπλασίες συνεχίζουν ακόμη και σήμερα να υποβαθμίζουν την παραγωγή των εκκολαπτηρίων ακόμα και στα πιο μελετημένα είδη όπως το λαβράκι και η τσιπούρα. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την έλλειψη μελετών σχετικά με την επιρροή περισσότερων του ενός παραγόντων (Sfakianakis *et al* 2006) και από την λάθος εκτίμηση στις αλλαγές των περιβαλλοντικών και διατροφικών παραγόντων κατά την διάρκεια της οντογένεσης (Mazurais *et al* 2009). Οι σκελετικές ανωμαλίες στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης, οι οποίες αφορούν κυρίως ιχθυοκαλλιέργειες σε θαλασσία ύδατα, είναι υπεύθυνες για την απώλεια εκατομμυρίων ευρώ ετησίως. Έτσι, μειώνοντας τις επιπτώσεις των δυσμορφιών στο στάδιο της προνύμφης, μειώνεται το κόστος παραγωγής τόσο στα εκκολαπτήρια όσο και στα εκτροφεία με αποτέλεσμα να βελτιώνεται η ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων (Fernandez *et al* 2008). Μελέτες σχετικά με την ποιότητα των εκκολαπτηρίων που περιλαμβάνουν ψάρια του θαλασσινού νερού, κατά την διάρκεια των τελευταίων 15 ετών, απέδειξαν ότι οι σκελετικές δυσπλασίες επηρεάζουν το 7-20% των νεαρών ατόμων της παραγωγής (Georgakopoulou *et al* 2010). Επιπλέον, οι σκελετικές αυτές παραμορφώσεις μπορούν

να επηρεάσουν το 45-100% του συνόλου των νεαρών ατόμων (Georgakopoulou *et al* 2010). Μια μείωση των σκελετικών ανωμαλιών της τάξης του 50% θα μπορούσε να διασώσει από τις Ευρωπαϊκές υδατοκαλλιέργειες περίπου 25.000.000 € ετησίως, καθώς οι ελάχιστες εκτιμώμενες απώλειες εξ' αιτίας των σκελετικών παραμορφώσεων ξεπερνούν τα 50.000.000 € ετησίως (Hough 2009, Boglione *et al* 2013a).

Οι σκελετικές παραμορφώσεις της σπονδυλικής στήλης όπως η σκολίωση και η λόρδωση έχουν μελετηθεί και περιγραφεί σε διάφορα εκτρεφόμενα είδη όπως το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) (Chatain 1994), ο κυπρίνος (*Cyprinus carpio*) (Backiel *et al* 1984), η πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) (Gjerde *et al* 2005), ο σολομός του Ατλαντικού (*Salmo salar*) (Sadler *et al* 2001), η τιλάπια (*Oreochromis niloticus*) (Mair 1992), κ.ά. Σε φυσικούς πληθυσμούς, η παρατήρηση σκελετικών δυσμορφιών είναι σπάνια είτε γιατί συναντώνται λιγότερα δύσμορφα άτομα είτε λόγω της δυσκολίας της παρατήρησης στα φυσικά περιβάλλοντα (Boglione *et al* 2001).

1.2 Οστίτης ιστός

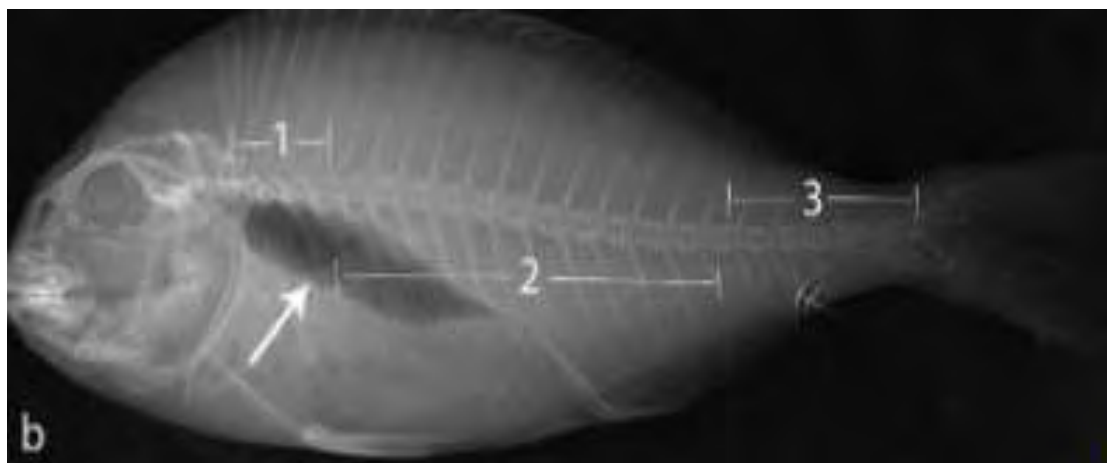
Ο οστίτης ιστός βρίσκεται στα οστά του σκελετού και τα χαρακτηριστικά του κύτταρα είναι οι οστεοβλάστες, οι οστεοκλάστες και τα οστεοκύτταρα (Κουσουλάκος 2007).

Ο συνολικός αριθμός των σπονδύλων της σπονδυλικής στήλης της τσιπούρας είναι 24. Στους οστειχθύες, τα μεσοσπονδύλια διαστήματα είναι $n-1$ όπου n ο συνολικός αριθμός των σπονδύλων, συνεπώς ο συνολικός αριθμός των μεσοσπονδύλιων διαστημάτων της τσιπούρας είναι 23. Κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης των σπονδυλωτών, ο χόνδρος είναι το πρώτο στοιχείο του σκελετού που διαμορφώνεται και

στην συνέχεια μετατρέπεται σε οστίτη ιστό (Faustino & Power 1998). Συνεπώς, στις προνύμφες των εκτρεφόμενων ατόμων η πρώτη δομή των οστών προσδιορίζεται περίπου στα 1-4,1 χιλιοστά του μήκους της νωτιαίας χορδής. Από τα 5,3 mm του μήκους της νωτιαίας χορδής, πριν από την έναρξη της οστεοποίησης, διακρίνεται η ακόλουθη χόνδρινη δομή: 23 νευρικά τόξα, 13 αιμικά τόξα και δύο από τα τέσσερα ζεύγη της παραπόφυσης. Τα νευρικά τόξα από το 1-4 και από το 15-23 σχηματίζονται στην νωτιαία χορδή κατά μήκος της ραχιαίας περιοχής, ενώ από το 5-14 εμφανίζονται στην ραχιαία πλευρά της νωτιαίας χορδής και κατά μήκος της κοιλιακής περιοχής. Εφόσον ολοκληρωθεί η χόνδρινη οντογένεση της σπονδυλικής στήλης, έπειτα λαμβάνει χώρα η έναρξη της οστεοποίησης. Η οστεοποίηση συμβαίνει όταν το πρότυπο μήκος την νωτιαίας χορδής είναι 5,7-6 mm (Faustino & Power 1998).

Η οστεοποίηση συμπίπτει με την ραχιαία κάμψη στο οπίσθιο άκρο της νωτιαίας χορδής και πραγματοποιείται διαδοχικά (Faustino & Power 1998). Στην διαδικασία της οντογένεσης κατά το στάδιο της προνύμφης σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η οστεονεκτίνη, η οποία είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που εμπλέκεται στην ανάπτυξη, τον σχηματισμό των οστών και των ανόργανων ουσιών (Estevao *et al* 2005).

Η ανάπτυξη λαμβάνει χώρα σε τέσσερις περιοχές της σπονδυλικής στήλης της τσιπούρας: (1) στην οπισθοκοιλιακή, (2) στην κεντρική κοιλιακή, (3) στην κεντρική ραχιαία και (4) στην οπισθοραχιαία (Faustino & Power 1998). Η σπονδυλική στήλη της τσιπούρας χωρίζεται σε 3 μέρη (Εικ. 1): στο αυχενικό το οποίο αποτελείται από 4 σπονδύλους, στο κοιλιακό που αποτελείται από 12 σπονδύλους και στο ουραίο που αποτελείται από 8 σπονδύλους (Berillis & Panagiotopoulos 2015).



Εικόνα 1: Άτομο χωρίς σκελετικές δυσμορφίες. Παρουσιάζονται οι τρεις περιοχές της σπονδυλικής στήλης: (1) αυχενική περιοχή, (2) ραχιαία περιοχή και (3) ουραία περιοχή. Με βέλος καταδεικνύεται η νηκτική κύστη.

1.3 Παράγοντες στους οποίους οφείλονται οι σκελετικές δυσμορφίες

Οι σκελετικές παραμορφώσεις αποτελούν μείζον ζήτημα της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων, της καλής διαβίωσης και της οικονομικά αποδοτικής παραγωγής της υδατοκαλλιέργειας των ψαριών. Η ανάπτυξή τους αποδίδεται σε πολλούς αιτιολογικούς παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν τα άτομα κυρίως κατά τα πρώτα στάδια της ζωής τους, παρουσιάζοντας κοινά συμπτώματα και αποτελέσματα (Koumoundouros *et al* 1997, 2001, 2002, Sfakianakis *et al* 2004, 2006, Villeneuve *et al* 2005, 2006). Η ανάπτυξη των σκελετικών παραμορφώσεων δεν είναι ακόμα καλά κατανοητή. Οι παράγοντες που συνεπάγονται αυτές τις δυσμορφίες έχουν διατροφική, περιβαλλοντική και γενετική προέλευση (Lall and Lewis-McCrea, 2007). Για την εμφάνιση της σκολίωσης, μπορεί να οφείλονται είτε οι παραπάνω παράγοντες (διατροφικοί, περιβαλλοντικοί, γενετικοί) ο καθένας ξεχωριστά, είτε μια αλληλεπίδραση αυτών (Castro *et al* 2008). Έχει αποδειχθεί ότι οι διατροφικές συνθήκες

και συγκεκριμένα η μειωμένη πρόσληψη ή η ανεπάρκεια βιταμινών, φωσφολιπιδίων και άλλων θρεπτικών συστατικών οδηγούν στην εμφάνιση σκελετικών ανωμαλιών σε εκτρεφόμενους ιχθύες (Nacario 1983, Hinton *et al* 1992). Επιπροσθέτως, άλλοι διατροφικοί παράγοντες, όπως το ασκορβικό οξύ, η τρυπτοφάνη, διάφορα αμινοξέα φαίνεται να επηρεάζουν την φυσιολογική ανάπτυξη του σκελετού των ιχθύων (Andrades *et al* 1996). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η απουσία ή η δυσλειτουργία της νηκτικής κύστεως και η μυϊκή δραστηριότητα του ουραίου πτερυγίου σχετίζονται με την παρουσία σκελετικών ανωμαλιών (Kihara *et al* 2002).

1.3.1 Διατροφικοί παράγοντες

Τα θρεπτικά συστατικά (φωσφολιπίδια, βιταμίνες, πρωτεΐνες) παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση σκελετικών δυσμορφιών, όταν η διατροφή είναι ελλιπής κατά τη διάρκεια της φάσης των προνυμφών υποδεικνύοντας τη σημασία της ικανοποίησης των διατροφικών απαιτήσεων κατά τη διάρκεια της μετα-εμβρυογονικής οντογένεσης (Cahu *et al* 2003). Μεταξύ αυτών των θρεπτικών συστατικών, η βιταμίνη Α εμπλέκεται στη διαφοροποίηση και στην ανάπτυξη των κυττάρων και των ιστών κατά την εμβρυϊκή και τη μετα-εμβρυϊκή ανάπτυξη (Maden 2000). Η μη ισορροπημένη χορήγηση βιταμίνης Α οδηγεί στην εμφάνιση σκελετικών δυσπλασιών, στην επιβράδυνση της ανάπτυξης και τέλος στην θνησιμότητα των ατόμων. Τα βέλτιστα επίπεδα της βιταμίνης Α έχουν προσδιοριστεί με την ενσωμάτωση των ποσοστών των δυσπλασιών τα οποία εμφανίζονται σε όλη την οντογενετική περίοδο από την πρώτη σίτιση έως την μεταμόρφωση (Mazurais *et al* 2009).

Επιπλέον, η βιταμίνη D είναι μια λιποδιαλυτή προ-ορμόνη η οποία είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του ασβεστίου και του φωσφόρου και την προστασία της σκελετικής ακεραιότητας (DeLuca 2004). Εκτός αυτού, η βιταμίνη D δρα άμεσα στους οστεοβλάστες, τα κύτταρα που σχηματίζουν τα οστά του σκελετού, με αποτέλεσμα να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό, να διαμορφώνουν τη διαφοροποίηση και να ρυθμίζουν την ανοργανοποίηση της εξωκυτταρικής ουσίας (Sutton *et al* 2005). Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω είναι σαφές ότι η χορήγηση της κατάλληλης ποσότητας της βιταμίνης D λειτουργεί ανασταλτικά στην εμφάνιση των σκελετικών παραμορφώσεων. Παρ' όλα αυτά, λίγες μελέτες υπάρχουν σχετικά με τον ακριβή ρόλο της βιταμίνης D στην ανάπτυξη των σκελετικών παραμορφώσεων στα ψάρια καθώς οι απαιτήσεις των ψαριών σε βιταμίνη D κατά τη διάρκεια της προνύμφης δεν είναι πλήρως καθορισμένες (Darias *et al* 2010).

Επιπροσθέτως, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα υψηλής ανθρακικής αλυσίδας και συγκεκριμένα το εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA) και το δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA) συμβάλλουν στην σωστή ανάπτυξη των νεαρών ιχθυδίων. Πολλοί ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει μια αναλογία DHA/EPA προκειμένου να προσδιοριστεί η απαιτούμενη ποσότητα των λιπαρών αυτών οξέων ώστε να μην επηρεαστεί η φυσιολογική ανάπτυξη των ιχθύων. Ο εμπλουτισμός της τροφής σε DHA και EPA συμβάλλει στην μείωση των σκελετικών ανωμαλιών στους εκτρεφόμενους ιχθύες (Gapasin & Duray 2001). Συγκεκριμένα, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και ειδικά το DHA προκάλεσε την μείωση των σκελετικών παραμορφώσεων στο είδος *Chanos Chanos* (Cahu *et al* 2003). Τέλος, η μειωμένη πρόσληψη ή η ανεπάρκεια τρυπτοφάνης και βιταμίνης C ή η υπερβολική πρόσληψη τυροσίνης αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στην δημιουργία σκελετικών δυσπασιών (Nacario 1983).

Η σημασία των φωσφολιπιδίων στην διατροφή των ιχθύων κυρίως στο στάδιο της προνύμφης, για την σωστή ανάπτυξη και την επιβίωση των προνυμφών έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές (Cahu *et al* 2003, Coutteaou *et al* 1997, Nacario 1983). Σύμφωνα με τους Geurden *et al.* (1995) η ανάπτυξη των προνυμφών είναι άμεσα συνδεδεμένη με τις πηγές των φωσφολιπιδίων της τροφής και από τα επίπεδά τους. Ακόμα, σύμφωνα με τους Cahu *et al.* (2003), η υψηλή περιεκτικότητα των φωσφολιπιδίων στην τροφή βελτίωσε την ανάπτυξη του λαβρακιού και απέδειξαν ότι οι προνύμφες έχουν την ικανότητα να «χρησιμοποιούν» τα φωσφολιπίδια της τροφής τους.

1.3.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Οι σκελετικές παραμορφώσεις σχετίζονται με περιβαλλοντικούς παράγοντες:

- α) μέσω νευρομυϊκών επιδράσεων, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε παραμόρφωση της σπονδυλικής στήλης, χωρίς αλλαγή της χημικής της σύνθεσης.
- β) μέσω της επιρροής των βιολογικών διεργασιών οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της βιοχημικής ακεραιότητας των οστών

Η θερμοκρασία του νερού επιδρά σημαντικά στην παρουσίαση δυσπλασιών όπως λόρδωση, σκολίωση, παραμορφώσεις του ουραίου και του ραχιαίου πτερυγίου. Η θερμοκρασία του νερού έχει μελετηθεί εκτενώς σε εκτροφές διαφόρων ειδών, καθώς επηρεάζει την ανάπτυξη, την επιβίωση και τις ανωμαλίες των μορφολογικών χαρακτηριστικών κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης (Georgakopoulou *et al* 2010). Η σκελετική ανωμαλία της σκολίωσης μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη χημικών ρύπων

στο περιβάλλον εκτροφής, όπως βαρέα μέταλλα, υδρογονάνθρακες κ.ά. Στην παρουσία σκελετικών ανωμαλιών στα εκτρεφόμενα είδη επιδρούν και άλλοι παράγοντες όπως η αλατότητα, το PH (Daoulas *et al* 1991), η ύπαρξη παρασίτων στο νερό (Lam *et al* 1991) και οι ανεπαρκείς υδροδυναμικές συνθήκες (Kentouri *et al* 1985). Τέλος, η παρουσία επιμολυντών στο νερό, τα πιθανά ραδιενεργά στοιχεία και η ένταση του φωτός επηρεάζουν την σκελετική ανάπτυξη των εκτρεφόμενων ατόμων (Haya *et al* 1989, Caris and Rice 1990).

1.3.3 Γενετικοί παράγοντες

Γενετικοί λόγοι όπως η κληρονομικότητα ή κάποια ενδεχόμενη γονιδιακή μετάλλαξη φαίνεται να οφείλονται για την εκκόλαψη των ατόμων που παρουσιάζουν λόρδωση (Navarro *et al* 2009). Σύμφωνα με τους Afonso *et al.* (2009) η παρουσία των παραμορφώσεων της σπονδυλικής στήλης και συγκεκριμένα η εμφάνιση της λόρδωσης, σε εκτρεφόμενες τσιπούρες, σχετίζεται με την ύπαρξη της αιμομιξίας. Η έλλειψη υπολειπόμενων αλληλόμορφων γονιδίων και η αναπαραγωγή συγγενικών μεταξύ τους ατόμων έχει παρατηρηθεί ως ο κυριότερος παράγοντας σκελετικών ανωμαλιών.

Τέλος, άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με τον χειρισμό των ατόμων και τις λειτουργίες της παραγωγικής διαδικασίας μπορεί να επιφέρουν αρνητικές συνέπειες στην ανάπτυξη των ατόμων. Οι λειτουργίες αυτές αφορούν την πυκνότητα των εναποθεσάντων αυγών, το ενδεχόμενο μηχανικό και θερμικό σοκ και την ιχθυοπυκνότητα των ιχθυοκλωβών (Haya *et al* 1989).

1.4 Η σκελετική δυσμορφία της σκολίωσης

Η σκολίωση είναι μια σκελετική δυσμορφία των οστών της σπονδυλικής στήλης και του νωτιαίου μυελού, η οποία έχει σχήμα «ζιγκ-ζιγκ», παρουσιάζοντας οξείες γωνίες και συνηθέστερα λαμβάνει χώρα στην ουραία περιοχή. Επίσης, είναι μια από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες σκελετικές δυσμορφίες στα εκτρεφόμενα είδη (Afonso *et al* 2000).

Η σκολίωση, όπως και κάθε σκελετική δυσπλασία δημιουργείται τόσο κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής αλλά και της μετα-εμβρυϊκής περιόδου της ζωής των ατόμων. Είναι πιθανό, σε ένα άτομο να συνυπάρχει με άλλες σκελετικές δυσμορφίες όπως στένωση, συγχώνευση σπονδύλων κ.ά. Ο πιο συχνός συνδυασμός είναι η ταυτόχρονη εμφάνιση της λόρδωσης, της σκολίωσης και της κύφωσης (σύνδρομο LSK) δημιουργώντας έτσι μια σειρά σκελετικών ανωμαλιών από την περιοχή του κεφαλιού έως και το ουραίο πτερύγιο (Afonso *et al* 2000). Η δυσμορφία της σκολίωσης μπορεί να υπάρχει «εκ γενετής» ή να εμφανίζεται μετά τη γέννηση και παρατηρείται συνήθως σε συνθήκες εντατικής εκτροφής (Chatain 1994). Μορφολογικά τα άτομα που εμφανίζουν σκολίωση διαφέρουν από τα φυσιολογικά καθώς το σχήμα του σώματος τους έχει το «ανώμαλο» σχήμα της σπονδυλικής τους στήλης. Επίσης, η νηκτική κύστη αρκετές φορές απουσιάζει. Διαφορές παρουσιάζονται και στους σπονδύλους καθώς μπορεί να εμφανίζεται στένωση, ανώμαλο σχήμα ή διαφορά στην περιεκτικότητα του ασβεστίου και του φωσφόρου. Εμφανίζεται στην προ-αιματική αλλά και στην αιματική περιοχή της σπονδυλικής στήλης και προκαλείται από διάφορους παράγοντες (Chatain 1989).

Το ασβέστιο και ο φώσφορος καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο ποσοστό των ανόργανων στοιχείων στα οστά των ιχθύων και η λειτουργία τους σχετίζεται με την

συντήρηση του σκελετικού τους συστήματος (Lewis-McCrea & Lall 2010). Το ανόργανο μέρος των οστών των ιχθύων αποτελούνται από άλατα υδροξυαπατίτη (κρύσταλλοι ασβεστίου-φωσφόρου όπου το 65% του ανόργανου μέρους είναι η ξηρή μάζα) τα οποία ενσωματώνονται στις χασματικές περιοχές του κολλαγόνου (κυρίως τύπου I). Το κολλαγόνο αντιπροσωπεύει το 90% του οργανικού μέρους των οστών. Η σχέση μεταξύ κολλαγόνου και υδροξυαπατίτη είναι σημαντική καθώς καθορίζει την ανθεκτικότητα και την ελαστικότητα των οστών (Berillis *et al* 2015). Ο καθορισμός του ποσοστού του Ca και του P στα οστά των σπονδυλίων, παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις αλλαγές στα ανόργανα συστατικά και βοηθά στην κατανόηση των μεταβολών αυτών οι οποίες υφίστανται εξαιτίας ασθενειών των οστών ή σκελετικών παραμορφώσεων (Berillis *et al* 2015).

1.5 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της σκελετικής δυσμορφίας της σκολίωσης, ο καθορισμός των παραγόντων που την προκαλούν, οι επιρροές της σκολίωσης στο μήκος των σπονδυλίων και στην σύσταση των ανόργανων στοιχείων τους και η αναζήτηση βελτιωτικών κινήσεων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συλλογή και μέτρηση δειγμάτων

Στην παρούσα εργασία συλλέχθηκαν συνολικά 20 ενήλικα άτομα τσιπούρας (*Sparus aurata*) από την μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας ΑΦΟΙ Δ. ΜΑΝΤΕ και ΣΙΑ ΟΕ, στην περιοχή Πελασγία Φθιώτιδας. Η συλλογή των δειγμάτων δεν ήταν τυχαία αλλά με γνώμονα να παρθούν παράλληλα φυσιολογικά και σκελετικά δύσμορφα άτομα. Τα άτομα προέρχονται από την ίδια παρτίδα εκκόλαψης. Τα ψάρια είχαν εκτραφεί σε θαλάσσιους ιχθυοκλωβούς σε πυκνότητα 8 kg/m^3 και διατράφηκαν στο στάδιο της πάχυνσης με εμπορική τροφή που περιείχε 46% ολική πρωτεΐνη και 17% ολικές λιπαρές ουσίες. Οι φυσικές και χημικές παράμετροι του νερού, συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας και του διαλυμένου οξυγόνου, κατά τη στιγμή της δειγματοληψίας, κυμαίνονταν από 21,5 °C έως 23,7 °C η θερμοκρασία και το διαλυμένο οξυγόνο από 8,1 έως 9,0 mg/l. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ένας φορητός ηλεκτρονικός μετρητής οξυγόνου και θερμοκρασίας. Τα εξεταζόμενα ψάρια συλλέχθηκαν από τον ίδιο κλωβό και εν συνεχεία θανατώθηκαν με εμβάπτιση σε μείγμα νερού και πάγου. Έπειτα, συντηρήθηκαν σε πάγο στους 0°C μέχρι να μετρηθούν και να ακτινογραφηθούν (1 ημέρα μετά). Από τα 20 συνολικά άτομα, τα 10 παρουσίαζαν την σκελετική δυσμορφία της σκολίωσης, ενώ τα υπόλοιπα 10 δεν παρουσίαζαν την σκελετική δυσμορφία της σκολίωσης. Τα 10 άτομα, εκτός από την σκολίωση παρουσίαζαν και άλλες σκελετικές δυσμορφίες, όπως λόρδωση των ραχιαίων σπονδύλων, στένωση και συγχώνευση σπονδύλων. Αρχικά, μετρήθηκε το ολικό μήκος με ιχθυόμετρο και το βάρος σε ζυγό ακριβείας των μη σκελετικών δύσμορφων ατόμων

με μέσο ολικό μήκος $27,39 \pm 3,04$ cm και μέσο βάρος $352,64 \pm 123,89$ gr. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα σκελετικά δύσμορφα άτομα με μέσο ολικό μήκος $25,11 \pm 2,88$ cm και μέσο βάρος $336,69 \pm 83,73$ gr.

Στα άτομα τα οποία δεν παρουσίαζαν σκελετικές δυσμορφίες μετρήθηκε με το πρόγραμμα syngofastView το μήκος των 24 σπονδύλων, αφού πρώτα οι σπόνδυλοι χωρίστηκαν στις 3 κύριες κατηγορίες: τους αυχενικούς όπου περιλαμβάνονται οι 4 πρώτοι σπόνδυλοι ξεκινώντας από το τέλος των βραγχοκαλυμμάτων, τους ραχιαίους όπου περιλαμβάνονται οι 12 επόμενοι σπόνδυλοι από το τέλος των αυχενικών και τέλος οι ουραίοι στους οποίους περιλαμβάνονται οι 8 τελευταίοι σπόνδυλοι από το τέλος των ραχιαίων έως το ουραίο πτερύγιο. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για την μέτρηση των συνολικά 24 επίσης σπονδύλων των ατόμων που παρουσίαζαν την σκελετική δυσμορφία της σκολίωσης κάνοντας χρήση του ίδιου προγράμματος.

Σε όλα τα εξεταζόμενα άτομα με την χρήση λαβίδας και νυστεριού, ανοίχθηκαν ιστολογικά παράθυρα με σκοπό την λήψη των σπονδύλων (Εικόνα 2). Από τα ψάρια τα οποία είχαν υποστεί σκολίωση αφαιρέθηκαν 3 σπόνδυλοι και αριθμήθηκαν από το 1 έως το 3. Ο σπόνδυλος 2 αριθμήθηκε ως ο σπόνδυλος με την μεγαλύτερη «γωνία» της σκολίωσης. Ο σπόνδυλος 1 ήταν ο σπόνδυλος από τα αριστερά του 2 (προς την περιοχή του κεφαλιού) ενώ ο σπόνδυλος 3 ήταν ο σπόνδυλος από τα δεξιά του 2 (προς την περιοχή του ουραίου πτερυγίου).

Εν συνεχεία, οι σπόνδυλοι με την μεγαλύτερη γωνία της σκολίωσης (σπόνδυλοι 2) τόσο από τα κανονικά όσο και από τα σκολιωμένα άτομα μεταφέρθηκαν στον αποτεφρωτή για 5 ώρες στους 600°C όπου υπέστησαν αποτέφρωση μέσα σε ειδικά προζυγισμένα πορσελάνινα δοχεία.

Μετρήθηκε το βάρος από τα δοχεία στα οποία είχαν τοποθετηθεί οι σπόνδυλοι (κατά την διαδικασία της μέτρησης του βάρους πριν και μετά την αποτέφρωση) και αφαιρέθηκαν από το αρχικό βάρος του ανόργανου αλλά και του οργανικού υλικού. Πραγματοποιήθηκε η αναγωγή στο 100% του οργανικού υλικού που απομακρύνθηκε από τον σπόνδυλο κατά την διαδικασία της αποτέφρωσης και του ανόργανου υλικού που παρέμεινε.

Στο ανόργανο υλικό που παρέμεινε μετά την αποτέφρωση των σπονδύλων των κανονικών και των σκολιωμένων ατόμων πραγματοποιήθηκε η μέθοδος φασματοσκοπίας ακτίνων X (EDS) για την ανίχνευση των στοιχείων που περιέχουν οι σπόνδυλοι.

Η μέθοδος EDS ή φασματοσκοπία ακτίνων X με διασπορά ενέργειας είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για την στοιχειακή ή την χημική ανάλυση ενός δείγματος. Για να διεγερθεί η εκπομπή των χαρακτηριστικών ακτίνων X από ένα δείγμα, στο δείγμα που μελετάται επικεντρώνεται μια ακτίνα υψηλής ενέργειας των φορτισμένων σωματιδίων (όπως ηλεκτρόνια ή πρωτόνια) και ως αποτέλεσμα αυτής της διέγερσης των χαρακτηριστικών ακτίνων είναι η αναγνώριση και η ανίχνευση του αντίστοιχου χημικού στοιχείου.

Κατά την διαδικασία της μεθόδου EDS, ο κάθε σπόνδυλος χωρίστηκε σε 3 φασματικές περιοχές όπου μετρήθηκε ο μέσος όρος όλων των στοιχείων στις 3 φασματικές περιοχές. Σε κάθε φασματική περιοχή για κάθε σπόνδυλο αφαιρέθηκε το ποσοστό του οξυγόνου και πραγματοποιήθηκε αναγωγή στο 100% των υπολοίπων στοιχείων με την μέθοδο των τριών. Ο τύπος του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σαρώσεως (SEM) είναι JSM-6510 LV της εταιρίας JEOL, ενώ το EDS που χρησιμοποιήθηκε για τις παραπάνω μετρήσεις ήταν της εταιρίας Oxford Instruments

(Εικόνες 3 και 4).

2.2 Μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα OriginPro 8. Η στατιστική ανάλυση των μηκών των σπονδύλων για τα τρία ζεύγη δειγμάτων ανά περιοχή ενδιαφέροντος (δηλαδή αυχενική, ραχιαία, ουραία), έγινε σε δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο εξετάστηκε εάν οι παρατηρήσεις των καθενός από τα δείγματα ξεχωριστά ακολουθούν την κανονική κατανομή ή όχι με την χρήση του Kolmogorov-Smirnov τεστ του λειτουργικού προγράμματος για την ραχιαία περιοχή, την ουραία περιοχή και τα μεσοσπονδύλια διαστήματα (όπου το μέγεθος των δειγμάτων είναι μεγαλύτερο από 50) και με την χρήση του Shapiro-Wilk τεστ του λειτουργικού προγράμματος για την αυχενική περιοχή (όπου το μέγεθος των δειγμάτων είναι μικρότερο από 50). Καθώς δείχθηκε από τα αποτελέσματα του πρώτου σταδίου η μη κανονικότητα των παρατηρήσεων των δειγμάτων, ακολούθησε η αντίστοιχη στατιστική επεξεργασία της διαφοράς των μέσων των τριών ζευγαριών, με την χρήση του μη παραμετρικού τεστ Mann-Whitney. Το παραπάνω τεστ είναι το καταλληλότερο για την επεξεργασία των συλλεχθέντων δεδομένων, διότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για δύο ανεξάρτητα τυχαία δείγματα, ένα από κάθε υπό εξέταση πληθυσμό και δεν απαιτεί τις υποθέσεις ισότητας των πληθυσμιακών διακυμάνσεων και την υπόθεση της ίδιας μορφής κατανομών για τους πληθυσμούς. Δυο σημαντικές προϋποθέσεις που ισχύουν για τα δεδομένα της παρούσας έρευνας, αποκλείοντας έτσι την χρήση άλλων σχετικών στατιστικών τεστ για την σύγκριση των μέσων δυο δειγμάτων.

Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε στους μέσους όρους των στοιχείων που εμφανίζονται σε όλους του σπονδύλους. Στα στοιχεία τα οποία δεν εμφανίζονται σε όλους τους σπονδύλους αναφέρεται το ποσοστό που ανιχνεύθηκε στους λίγους αυτούς σπονδύλους. Εφόσον η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε στους μέσους όρους των στοιχείων των τριών φασματικών περιοχών στα 10 σκολιωμένα και στα 10 κανονικά άτομα το μέγεθος του δείγματος είναι 10 για κάθε χημικό στοιχείο. Επειδή $N=10$ για τον έλεγχο της κανονικότητας του δείγματος πραγματοποιήθηκε το τεστ κανονικότητας Shapiro-Wilk του λειτουργικού προγράμματος. Τα δεδομένα δεν ακολούθησαν την κανονική κατανομή οπότε για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε το μη παραμετρικό τεστ Mann-Whitney.

Οι τιμές των δειγμάτων που ακολουθούν την κανονική κατανομή παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, ενώ οι τιμές των δειγμάτων που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή παρουσιάζονται ως διάμεσος \pm ενδοτεταρτημοριακό εύρος. Το επίπεδο σημαντικότητας το οποίο έκρινε τη σημαντικότητα μεταξύ των παρατηρήσεων των δειγμάτων ορίστηκε ως το 0,05.



Εικόνα 2: Ιστολογικό παράθυρο για την λήψη των σπονδύλων (προσωπικό αρχείο)



Εικόνα 3: Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Σαρώσεως (προσωπικό αρχείο)



Εικόνα 4: Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο
σαρώσεως (προσωπικό αρχείο)

3. ΑΠΟΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται τα ολικά μήκη των είκοσι συνολικά ατόμων για τις δύο κατηγορίες των ιχθύων. Το μέσο ολικό μήκος των σκελετικά δύσμορφων ατόμων είναι $25,11 \pm 0,9$ και των φυσιολογικών ατόμων είναι $27,39 \pm 0,96$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικά σφάλματα καθώς τα δεδομένα ακολουθούσαν την κανονική κατανομή και δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

Πίνακας 3.1: Ολικό μήκος των φυσιολογικών και των σκελετικά δύσμορφων ατόμων

Σκολιωμένα άτομα		Μη σκελετικά δύσμορφα άτομα	
A/A	Ολικό μήκος (cm)	A/A	Ολικό μήκος (cm)
1	22,8	1	28,6
2	29,9	2	29,1
3	24,3	3	28,6
4	27	4	28,6
5	24,2	5	30,4
6	19,2	6	30
7	26	7	23,3
8	26,9	8	24,4
9	24,3	9	29,1
10	26,5	10	21,8

Μέσος όρος	25,11±0,91 ^a		27,39±0,96 ^a
± τυπικό σφάλμα			

Σημ: Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα. Οι μέσοι όροι που έχουν το ίδιο εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά ($P>0,05$).

Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται τα ολικά βάρη των είκοσι συνολικά ατόμων για τις δύο κατηγορίες των ιχθύων. Το μέσο ολικό βάρος των σκελετικά δύσμορφων ατόμων είναι $336,69 \pm 26,48$ και των φυσιολογικών ατόμων είναι $352,64 \pm 39,18$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπικά σφάλματα καθώς τα δεδομένα ακολουθούσαν την κανονική κατανομή και δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

Πίνακας 3.2: Ολικό βάρος των φυσιολογικών και των σκελετικά δύσμορφων ατόμων

Σκολιωμένα άτομα		Μη σκελετικά δύσμορφα άτομα	
A/A	Ολικό βάρος (gr)	A/A	Ολικό βάρος (gr)
1	275,52	1	402,84
2	497,42	2	395,44
3	299,02	3	446,86
4	368,91	4	407,61
5	314,92	5	475,94
6	171	6	433,66
7	356,1	7	181,29
8	372,29	8	222,28

9	336,41	9	427,36
10	375,28	10	133,15
Μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα	336,69±26,48 ^a		352,64±39,18 ^a

Σημ: Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα. Οι μέσοι όροι που έχουν το ίδιο εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά ($P>0,05$).

Στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζονται τα εκατοστιαία ποσοστά του ανόργανου υλικού των οστών για κάθε άτομο των δύο υπό εξεταζόμενων ομάδων (σκολιωμένων και κανονικών ατόμων). Το μέσο εκατοστιαίο ποσοστό του ανόργανου υλικού των σκολιωμένων ατόμων ανέρχεται στα $22,29\pm 2,24$ και το μέσο εκατοστιαίο ποσοστό του ανόργανου υλικού των φυσιολογικών ατόμων ανέρχεται στα $23,26\pm 3,86$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος ± ενδοτεταρτημοριακό εύρος καθώς τα αποτελέσματα δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή και δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Οι παραπάνω τιμές εκφράζουν τα ποσοστά των ανόργανων υλικών που καταμετρήθηκαν μετά το πέρας της διαδικασίας της αποτέφρωσης των οστών.

Πίνακας 3.3: Ποσοστό ανόργανου υλικού στα φυσιολογικά και στα σκελετικά δύσμορφα άτομα

A/A	ΑΝΟΡΓΑΝΟ ΥΛΙΚΟ ΣΚΟΛΙΩΜΕΝΩΝ (%)	ΑΝΟΡΓΑΝΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΝΟΝΙΚΩΝ (%)
1	21,52	24,81
2	19,83	27,06
3	23,3	23,18
4	23,63	21,39
5	22,94	24,57
6	20,71	20,43
7	21,98	20,71
8	18,52	23,43
9	22,95	23,34

10	22,59	18,69
Μέσος \pm Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	22,29 \pm 2,24 ^a	23,26 \pm 3,86 ^a

Σημ: Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος \pm ενδοτεταρτημοριακό εύρος. Οι μέσοι που έχουν το ίδιο εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά ($P>0,05$).

Στον Πίνακα 3.4 παρουσιάζονται τα εκατοστιαία ποσοστά του οργανικού υλικού των οστών για κάθε άτομο των δύο υπό εξεταζόμενων ομάδων (σκολιωμένων και κανονικών ατόμων). Το μέσο εκατοστιαίο ποσοστό του οργανικού υλικού των σκολιωμένων ατόμων ανέρχεται στα $77,72 \pm 2,24$ και το μέσο εκατοστιαίο ποσοστό του οργανικού υλικού των φυσιολογικών ατόμων ανέρχεται στα $76,74 \pm 3,86$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος \pm ενδοτεταρτημοριακό εύρος καθώς τα αποτελέσματα δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή και δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Οι παραπάνω τιμές εκφράζουν τα ποσοστά του ανόργανου υλικού που καταμετρήθηκαν πριν την διαδικασία της αποτέφρωσης των οστών.

Πίνακας 3.4: Ποσοστό οργανικού υλικού στα φυσιολογικά και στα σκελετικά δύσμορφα άτομα

A/A	ΟΡΓΑΝΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΣΚΟΛΙΩΜΕΝΩΝ	ΟΡΓΑΝΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΝΟΝΙΚΩΝ
1	78,48	75,19
2	80,17	72,94
3	76,7	76,82
4	76,37	78,61
5	77,06	75,43
6	79,29	79,57
7	78,02	79,29
8	81,48	76,57
9	77,05	76,66
10	77,41	81,31

Μέσος \pm Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	77,72 \pm 2,24 ^a	76,74 \pm 3,86 ^a
--	-------------------------------	-------------------------------

Σημ: Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος \pm ενδοτεταρτημοριακό εύρος. Οι μέσοι που έχουν το ίδιο εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά ($P>0,05$).

Στον Πίνακα 3.5 παρουσιάζονται οι συνολικές παρατηρήσεις (N) για κάθε υπό εξεταζόμενη περιοχή της σπονδυλικής στήλης στις δύο ομάδες των ιχθύων καθώς και τα μέσα μήκη. Ο αριθμός των συνολικών παρατηρήσεων διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων καθώς από την ομάδα των σκελετικά δύσμορφων ατόμων ένα άτομο τέθηκε εκτός στατιστικής επεξεργασίας. Το ψάρι παρουσίαζε έντονες σκελετικές παραμορφώσεις οι οποίες αλλοίωσαν την εικόνα της ακτινογραφίας με αποτέλεσμα να καθίσταται αδύνατη η συλλογή των μετρήσεων (Εικόνα 5). Έτσι, για τις συνολικά 40 παρατηρήσεις των φυσιολογικών ατόμων το μέσο μήκος των σπονδύλων της αυχενικής περιοχής ανήλθε στα $5,0 \pm 1,8$ ενώ για τις συνολικά 36 παρατηρήσεις των σκολιωμένων ατόμων το μέσο μήκος των σπονδύλων της αυχενικής περιοχής ανήλθε στα $5,05 \pm 1,4$. Τα αποτελέσματα των μηκών των αυχενικών σπονδύλων μεταξύ των δύο ομάδων δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Αντίστοιχα, για τις συνολικά 120 παρατηρήσεις των φυσιολογικών ατόμων το μέσο μήκος των σπονδύλων της ραχιαίας περιοχής ανήλθε

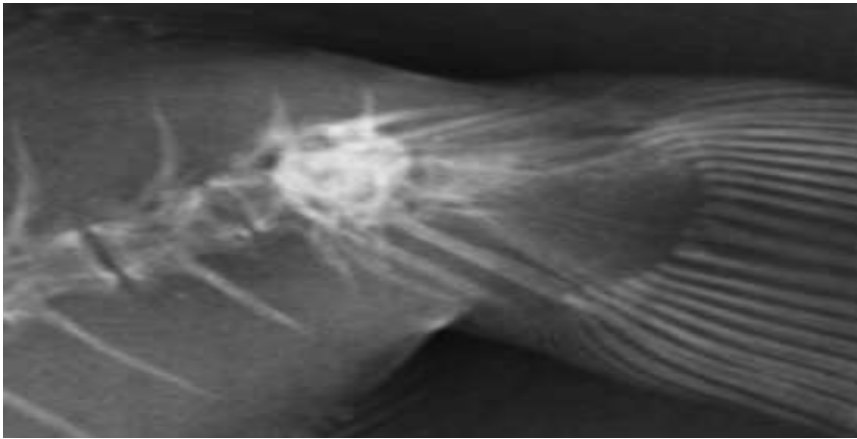
στα $7,7 \pm 1,8$ ενώ για τις συνολικά 108 παρατηρήσεις των σκολιωμένων ατόμων το μέσο μήκος των σπονδύλων της ραχιαίας περιοχής ανήλθε στα $5 \pm 1,3$. Το μέσο μήκος των ραχιαίων σπονδύλων διαφέρει στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στις δύο ομάδες των ιχθύων. Τέλος, για τις συνολικά 80 παρατηρήσεις των φυσιολογικών ατόμων το μέσο μήκος των σπονδύλων της ουραίας περιοχής είναι $6,6 \pm 3,2$ ενώ για τις συνολικά 72 παρατηρήσεις των σκολιωμένων ατόμων το μέσο μήκος των σπονδύλων της ουραίας περιοχής είναι $5,1 \pm 2,1$. Τα αποτελέσματα των μηκών των ουραίων σπονδύλων μεταξύ των φυσιολογικών και των σκελετικά δύσμορφων ατόμων διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Τα στοιχεία του πίνακα 3.5 παρουσιάζονται ως μέσος \pm ενδοτεταρτημοριακό εύρος καθώς τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή.

Πίνακας 3.5: Μήκη (mm) των σπονδύλων για τις δύο ομάδες των ιχθύων.

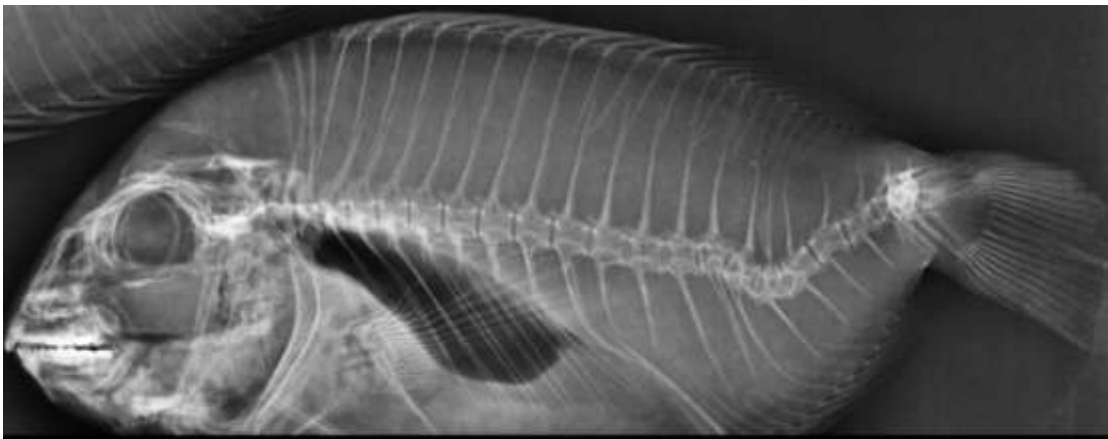
	Αυχενική περιοχή (mm)		Ραχιαία περιοχή (mm)		Ουραία περιοχή (mm)	
Φυσιολογικά άτομα	$5,0 \pm 1,8^a$	N =40	$7,7 \pm 1,8^a$	N=120	$6,6 \pm 3,2^a$	N =80
Σκολιωμένα άτομα	$5,05 \pm 1,4^a$	N =36	$7,0 \pm 1,3^b$	N =108	$5,1 \pm 2,1^b$	N =72

Σημ: Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος \pm ενδοτεταρτημοριακό εύρος. Η σύγκριση των δεδομένων γίνεται μεταξύ των περιοχών της σπονδυλικής στήλης τόσο για τα φυσιολογικά όσο και για τα σκελετικά δύσμορφα άτομα. Οι μέσοι που έχουν το ίδιο εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά ($P>0,05$) ενώ οι μέσοι με διαφορετικό εκθέτη

διαφέρουν σημαντικά ($P<0,05$).



Εικόνα 5: Η περιοχή με την έντονη σκελετική αλλοίωση



Εικόνα 6: Το ψάρι που τέθηκε εκτός στατιστικής επεξεργασίας

Στον Πίνακα 3.6 παρουσιάζονται οι συνολικές παρατηρήσεις (N) για κάθε υπό εξεταζόμενη περιοχή της σπονδυλικής στήλης στις δύο ομάδες των ιχθύων καθώς και

τα μέσα μήκη των μεσοσπονδύλιων διαστημάτων. Ο αριθμός των συνολικών παρατηρήσεων (N) των μηκών των μεσοσπονδύλιων διαστημάτων διαφέρει από τον συνολικό αριθμό παρατηρήσεων των μηκών των σπονδύλων καθώς ο συνολικός αριθμός των μεσοσπονδύλιων διαστημάτων είναι N-1 (όπου N ο αριθμός των σπονδύλων της σπονδυλικής στήλης της τσιπούρας). Επιπλέον, ο αριθμός των συνολικών παρατηρήσεων διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων καθώς από την ομάδα των σκελετικά δύσμορφων ατόμων ένα άτομο τέθηκε εκτός στατιστικής επεξεργασίας διότι το ψάρι παρουσίαζε έντονες σκελετικές παραμορφώσεις οι οποίες αλλοίωσαν την εικόνα της ακτινογραφίας με αποτέλεσμα να καθίσταται αδύνατη η συλλογή των μετρήσεων. Έτσι, για τις συνολικά 40 παρατηρήσεις των φυσιολογικών ατόμων το μέσο μήκος των μεσοσπονδύλιων διαστημάτων της αυχενικής περιοχής ανήλθε στα $0,67 \pm 0,03$ ενώ για τις συνολικά 36 παρατηρήσεις των σκολιωμένων ατόμων το μέσο μήκος των μεσοσπονδύλιων διαστημάτων της αυχενικής περιοχής ανήλθε στα $0,57 \pm 0,02$. Τα αποτελέσματα των μηκών των μεσοσπονδύλιων διαστημάτων της αυχενικής περιοχής μεταξύ των δύο ομάδων δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Αντίστοιχα, για τις συνολικά 120 παρατηρήσεις των φυσιολογικών ατόμων το μέσο μήκος των μεσοσπονδύλιων διαστημάτων της ραχιαίας περιοχής ανήλθε στα $0,68 \pm 0,01$ ενώ για τις συνολικά 108 παρατηρήσεις των σκολιωμένων ατόμων το μέσο μήκος των μεσοσπονδύλιων διαστημάτων της ραχιαίας περιοχής ανήλθε στα $0,66 \pm 0,02$. Το μέσο μήκος των μεσοσπονδύλιων διαστημάτων της ραχιαίας περιοχής διαφέρει στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στις δύο ομάδες των ιχθύων. Τέλος, για τις συνολικά 70 παρατηρήσεις των φυσιολογικών ατόμων το μέσο μήκος των μεσοσπονδύλιων διαστημάτων της ουραίας περιοχής είναι $0,66 \pm 0,02$ ενώ για τις συνολικά 63 παρατηρήσεις των σκολιωμένων ατόμων το μέσο μήκος των μεσοσπονδύλιων

διαστημάτων της ουραίας περιοχής είναι $0,49 \pm 0,02$. Τα αποτελέσματα των μηκών των μεσοσπονδύλιων διαστημικών της ουραίας περιοχής μεταξύ των φυσιολογικών και των σκελετικά δύσμορφων ατόμων διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Τα στοιχεία του Πίνακα 3.6 παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικά σφάλματα καθώς τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή.

Πίνακας 3.6: Μήκη (mm) των μεσοσπονδύλιων διαστημάτων για τις δύο ομάδες των ιχθύων

	Αυχενική περιοχή (mm)		Ραχιαία περιοχή (mm)		Ουραία περιοχή (mm)	
Φυσιολογικά άτομα	$0,67 \pm 0,03^a$	N =40	$0,68 \pm 0,01^a$	N =120	$0,66 \pm 0,02^a$	N =70
Σκολιωμένα άτομα	$0,57 \pm 0,02^a$	N =36	$0,66 \pm 0,02^b$	N =108	$0,49 \pm 0,02^b$	N =63

Σημ: Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα. Οι μέσοι όροι που έχουν το ίδιο εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά ($P > 0,05$). Η σύγκριση των δεδομένων γίνεται μεταξύ των περιοχών της σπονδυλικής στήλης τόσο για τα φυσιολογικά όσο και για τα σκελετικά δύσμορφα άτομα. Οι μέσοι που έχουν το ίδιο εκθέτη δεν διαφέρουν

σημαντικά ($P>0,05$) ενώ οι μέσοι με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ($P<0,05$).

Στον Πίνακα 3.7 αναφέρονται τα ποσοστά επί τοις εκατό του ασβεστίου και του φωσφόρου στα φυσιολογικά και στα σκελετικά δύσμορφα άτομα καθώς και η αναλογία ασβεστίου/φωσφόρου. Με βάση τους δείκτες στον πίνακα των ποσοστών των Ca, P και Ca/P κατανοούμε ότι τα υπό εξέταση ποσοστά δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά για τις δύο ομάδες των ιχθύων. Εφόσον, τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή τα ποσοστά του πίνακα παρουσιάζονται ως μέσος \pm ενδοτεταρτημοριακό εύρος.

Πίνακας 3.7: Ποσοστό Ca και P (%) στους σπονδύλους των φυσιολογικών και των σκελετικά δύσμορφων ατόμων

	Ca	P	Αναλογία Ca/P
Φυσιολογικά άτομα	$57,25 \pm 3,14^a$	$33,29 \pm 1,43^a$	$1,72 \pm 0,15^a$
Σκολιωμένα άτομα	$57,31 \pm 3,28^a$	$32,64 \pm 1,62^a$	$1,76 \pm 0,16^a$

Σημ: Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος \pm ενδοτεταρτημοριακό εύρος. Οι μέσοι που έχουν το ίδιο εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά ($P>0,05$) ενώ οι μέσοι με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ($P<0,05$).

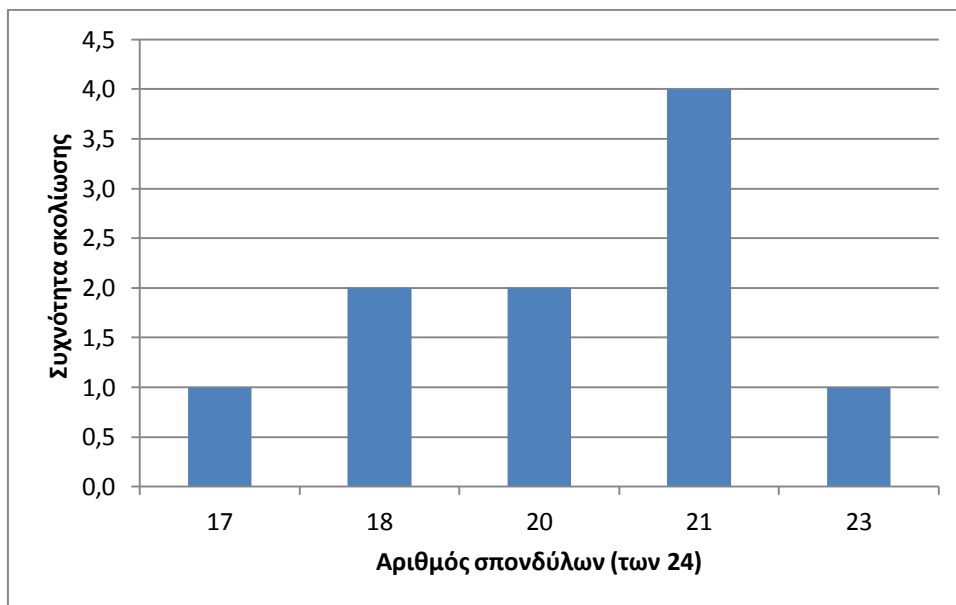
Στον Πίνακα 3.8 αναφέρονται τα ποσοστά επί τοις εκατό όλων των ανόργανων στοιχείων που εμφανίζονται στους σπονδύλους και των 20 παρατηρούμενων ατόμων μετά το πέρας της διαδικασίας της αποτέφρωσης. Ο σπόνδυλος ο οποίος υπέστη αποτέφρωση ήταν ο σπόνδυλος 2, δηλαδή ο σπόνδυλος με την μεγαλύτερη γωνία της σκολίωσης. Τα παραπάνω ποσοστά ανήχθησαν από τον μέσο όρο των ποσοστών των τριών φασματικών περιοχών τα οποία ορίστηκαν κατά την διαδικασία της φασματοσκοπίας με ακτίνες X (EDS). Με βάση τους δείκτες στον πίνακα των ποσοστών κατανοούμε ότι τα υπό εξέταση ποσοστά του ασβεστίου, του φωσφόρου, του νατρίου, του μαγνησίου, του χλωρίου, του ιριδίου και του χαλκού δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά για τις δύο ομάδες των ιχθύων. Αντίθετα, τα ποσοστά του καλίου διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των φυσιολογικών και των σκολιωμένων ατόμων. Εφόσον, τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή τα ποσοστά του πίνακα παρουσιάζονται ως μέσος \pm ενδοτεταρτημοριακό εύρος.

Πίνακας 3.8: Ποσοστά (%) των ανόργανων στοιχείων στα φυσιολογικά και στα σκελετικά δύσμορφα άτομα

ΑΝΟΡΓΑΝΟ ΣΤΟΙΧΕΙΟ	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΤΟΜΑ	ΣΚΕΛΕΤΙΚΑ ΔΥΣΜΟΡΦΑ
Ca	$57,25 \pm 3,14^a$	$57,31 \pm 3,28^a$
P	$33,29 \pm 1,43^a$	$32,64 \pm 1,62^a$
Na	$2,83 \pm 0,75^a$	$3,09 \pm 1,09^a$
K	$2,75 \pm 0,8^a$	$2,34 \pm 0,74^b$
Mg	$1,63 \pm 0,31^a$	$1,66 \pm 0,48^a$

Cl	$1,08 \pm 0,51^a$	$1,23 \pm 0,47^a$
Ir	$0,42 \pm 0,32^a$	$0,48 \pm 0,39^a$
Cu	$0,19 \pm 0,28^a$	$0,27 \pm 0,31^a$

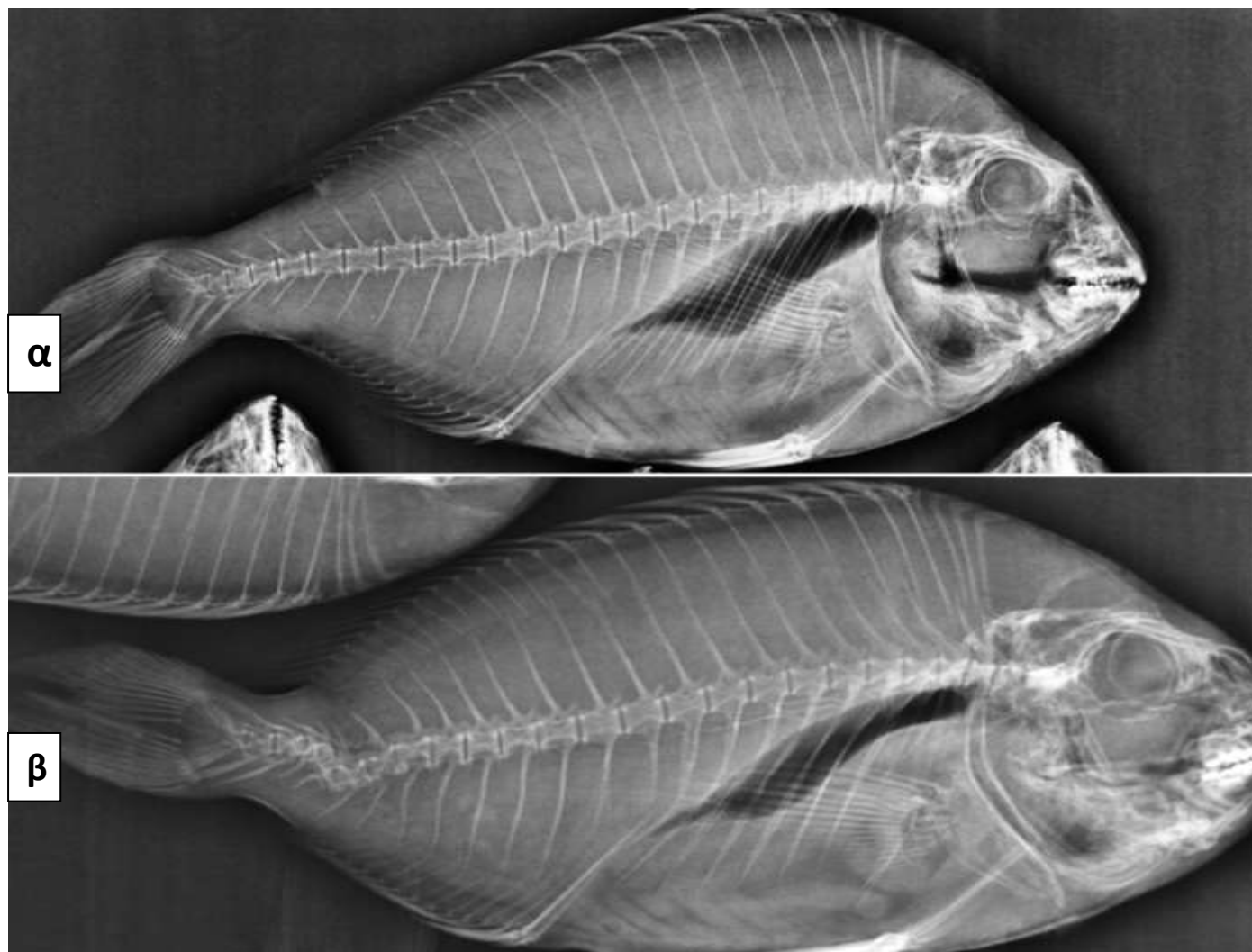
Σημ: Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος \pm ενδοτεταρτημοριακό εύρος. Οι μέσοι που έχουν το ίδιο εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά ($P>0,05$) ενώ οι μέσοι με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ($P<0,05$).



Εικόνα 7: Ιστογράμμα συχνότητας της σκολίωσης στους 24 σπονδύλους της τσιπούρας

Στην Εικόνα 9 εμφανίζεται το ιστογράμμα συχνότητας της σκολίωσης στον κάθε αριθμημένο σπόνδυλο (από 1-24). Για την κατασκευή του παραπάνω ιστογράμματος καταγράφηκε ο σπόνδυλος ο οποίος παρουσιάζει την μεγαλύτερη γωνία της σκολίωσης για κάθε σκολιωμένο άτομο. Παρατηρούμε, ότι ο σπόνδυλος στον οποίο λαμβάνει χώρα

συχνότερα η σκελετική δυσμορφία της σκολίωσης είναι ο 21^{ος}, καθώς έλαβε χώρα στα 4 από τα συνολικά 10 σκολιωμένα άτομα. Στην συνέχεια, ακολουθούν ο 18^{ος} και ο 20^{ος} (με δύο παρατηρήσεις έκαστος) και τέλος ο 17^{ος} και ο 23^{ος} (με μία παρατήρηση έκαστος).



Εικόνα 8: α) Άτομο χωρίς σκελετικές δυσμορφίες και β) άτομο με την σκελετική δυσμορφία της σκολίωσης. Με βέλος καταδεικνύεται η νηκτική κύστη.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) είναι ένα από τα κυριότερα εκτρεφόμενα είδη της Μεσογείου. Οι σκελετικές παραμορφώσεις που συνήθως παρουσιάζονται επηρεάζουν την εξωτερική μορφολογία, την ανάπτυξη, το ποσοστό επιβίωσης και τέλος το κόστος παραγωγής. Εμφανίζονται κυρίως κατά την διάρκεια των προνυμφικών και νεανικών σταδίων, ενώ οι λόγοι που οδηγούν στον σχηματισμό των παραμορφώσεων δεν είναι σαφείς, σχετίζονται όμως με διατροφικούς, περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες (Fernandez *et al* 2008). Τα ψάρια τα οποία φέρουν οποιαδήποτε σκελετική δυσμορφία είτε απορρίπτονται και δεν διατίθενται προς πώληση είτε πωλούνται σε χαμηλότερη τιμή από την προβλεπόμενη τιμή της αγοράς τους (Boglione *et al* 2013 a,b). Για τους παραπάνω λόγους κρίνεται επιτακτική η ανάγκη περαιτέρω μελέτης των σκελετικών παραμορφώσεων, ώστε να γνωστοποιηθούν οι λόγοι εμφάνισης τους και να παρθούν τα κατάλληλα μέτρα πρόληψης προσαρμόζοντας κατάλληλα το περιβάλλον και τις συνθήκες εκτροφής. Η μελέτη των (Bengtsson *et al* 1979) αποτελεί μια απόδειξη του παραπάνω ισχυρισμού καθώς οι σκελετικές παραμορφώσεις των ιχθύων χρησιμοποιήθηκαν και ως βιολογικοί δείκτες για την παρακολούθηση της θαλάσσιας ρύπανσης.

Στην παρούσα εργασία, όλα τα υπό εξεταζόμενα άτομα διέθεταν λειτουργική νηκτική κύστη. Δηλαδή, η κίνηση και η λειτουργία της νηκτικής κύστης ήταν φυσιολογική. Έρευνες τόσο στην τσιπούρα (*Sparus aurata*) όσο και στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) παρουσιάζουν συσχέτιση της εμφάνισης σκελετικών δυσμορφιών με την παρουσία και την λειτουργία της νηκτικής κύστης. Συγκεκριμένα, σε περίπτωση μη φυσιολογικής λειτουργίας της νηκτικής κύστεως παρουσιάζεται κυρτότητα στην σπονδυλική στήλη, στο σημείο εκείνο όπου η κίνηση των μυών είναι υψηλότερη (Chatain 1994). Η παρατήρηση αυτή δεν φαίνεται να συνάδει με τα

αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αφού τα άτομα διέθεταν όλα λειτουργική νηκτική κύστη. Στις προνύμφες του γάδου (*Gadus morhua*) η υπερλειτουργία της νηκτικής κύστης προκάλεσε ανωμαλίες στην νωτιαία χορδή όπου στην συνέχεια εξελίχθηκε σε ανωμαλία των αυχενικών σπονδύλων (Grotmol *et al* 2005). Οι Santamaria *et al* (1994) παρατήρησαν την παρουσία λόρδωσης στην νωτιαία χορδή σε προνύμφες τσιπούρας, 18 ημέρες μετά την εκκόλαψη. Σύμφωνα με τους Prestinicola *et al* (2014) η εμφάνιση υψηλού ποσοστού σκελετικών ανωμαλιών επηρεάζει σημαντικά τα ιχθύδια με μη λειτουργική νηκτική κύστη. Σε άλλες έρευνες, υποστηρίζεται ότι η παρουσία της σκελετικής δυσμορφίας της λόρδωσης στα εκτρεφόμενα λαβράκια δεν σχετίζεται άμεσα με την απουσία ή την μη λειτουργία της νηκτικής κύστης, διότι η λόρδωση παρουσιάζεται και σε ιχθύδια με λειτουργική νηκτική κύστη εάν τα ρεύματα της δεξαμενής είναι υψηλότερα από 10 cm/s (Divanach *et al* 1997). Αυτό επιβεβαιώνεται και από την παρούσα μελέτη καθώς τόσο τα σκολιωμένα όσο και τα φυσιολογικά άτομα διέθεταν φυσιολογική και λειτουργική νηκτική κύστη.

Τα θρεπτικά συστατικά επηρεάζουν την ανάπτυξη και την επιβίωση των προνυμφών και των νεαρών ατόμων, αλλά και την ανάπτυξη του σκελετού. Στην παρούσα εργασία, και οι δύο ομάδες ατόμων σιτίστηκαν με την ίδια τροφή και η περιεκτικότητα του λίπους ήταν 17%. Παράλληλα, η σύσταση της τροφής σε φωσφολιπίδια δεν ήταν γνωστή, παρότι άλλες μελέτες έδειξαν ότι η συγκέντρωση φωσφολιπιδίου 12% συμπεριλαμβανομένης 1,6% φωσφατιδυλινοσιτόλης σε ξηρά τροφή βελτιώνει την σκελετική ανάπτυξη, ενώ η ανεπάρκεια αυτών των συστατικών οδηγεί σε δυσπλασίες, σε πολλά είδη όπως στο *Dicentrarchus labrax*, στο είδος *Chanos Chanos* και στο *Paralichthys olivaceus* (Cahu *et al* 2003 b). Η χαμηλή περιεκτικότητα της χορηγούμενης ζωντανής τροφής σε DHA (εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ)

σε άτομα του είδους *Pagrus pagrus*, οδήγησε στην παρουσία σκελετικών παραμορφώσεων, υποδηλώνοντας τον σημαντικό ρόλο του DHA στην πρόληψη της δημιουργίας παραμορφώσεων στο στάδιο όπου παρέχεται η ζωντανή τροφή (Roo *et al* 2009). Στην παρούσα εργασία, δεν δύναται να εξηγηθούν οι παραμορφώσεις σε διατροφικούς παράγοντες διότι δεν υπήρξε ανάλογος πειραματικός σχεδιασμός. Μια πιο αναλυτική και λεπτομερής γνώση της σύστασης της τροφής που χορηγήθηκε στα άτομα της παρούσας έρευνας, θα μπορούσε να δώσει μια πιο σαφή εικόνα, σχετικά με την επιρροή των θρεπτικών συστατικών της συγκεκριμένης τροφής και της εμφάνισης της σκολίωσης.

Στην παρούσα μελέτη, η σύσταση των βιταμινών και των ανόργανων στοιχείων δεν ήταν γνωστή οπότε υπάρχει το ενδεχόμενο η παρουσίαση της σκολίωσης να οφείλεται στην ανεπάρκεια ή στην αυξημένη ποσότητα κάποιας βιταμίνης (ή βιταμινών) ή ανόργανων στοιχείων. Ο ρόλος των θρεπτικών ουσιών είναι βασικός για την ανάπτυξη του σκελετού και ιδιαίτερα του φωσφόρου, της βιταμίνης Α και της βιταμίνης Κ, και είτε ανεπάρκεια τους είτε η τοξικότητα τους οδηγούν σε σκελετικές παραμορφώσεις (Lall & Lewis-McCrea 2007). Στο λαβράκι και στην τσιπούρα, επίσης, η ανεπάρκεια της βιταμίνης C φέρει ως αποτέλεσμα διάφορες σκελετικές παραμορφώσεις (κύφωση, λόρδωση, σκολίωση), ενώ η αύξηση της ποσότητας της βιταμίνης C μειώνει την παρουσία των σκελετικών ανωμαλιών (Divanach *et al* 1996). Σύμφωνα με τους Lim και Lowell (1978) η ανεπάρκεια της βιταμίνης C στο είδος *Ictalurus punctatus* οδήγησε στην παρουσία παραμορφώσεων της σπονδυλικής στήλης και μείωση της περιεκτικότητας των οστών σε κολλαγόνο.

Στα σιτηρέσια συχνά χρησιμοποιούνται διάφορες υδρολυμένες πρωτεΐνες ως πρωτεϊνικές πηγές συμβάλλοντας στην ανάπτυξη των προνυμφών και των ιχθυδίων σε πολλά είδη του γλυκού και του αλμυρού νερού, όπως ο κυπρίνος *Cyprinus carpio*

(Carvalho *et al* 1997), η ιριδίζουσα πέστροφα (Dabrowski *et al* 2003), το Ευρωπαϊκό λαβράκι (Cahu *et al* 1999), η τσιπούρα (Gisbert *et al* 2012) κ.ά. Οι τύποι των υδρολυμένων πρωτεϊνών και το ποσοστό χορήγησης αυτών στο σιτηρέσιο, φαίνεται να επηρεάζουν την ορθή ανάπτυξη του σκελετού των παραπάνω ειδών με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν διάφορες σκελετικές δυσπλασίες συμπεριλαμβανομένης και της σκολίωσης (Gisbert *et al* 2012). Συμπερασματικά, το χαμηλό ποσοστό των υδρολυμένων πρωτεϊνών σε ένα σιτηρέσιο μπορεί να οδηγήσει σε σκελετικές δυσπλασίες.

Η θερμοκρασία του νερού στους θαλάσσιους ιχθυοκλωβούς όπου εκτράφηκαν τα 20 εξεταζόμενα άτομα τσιπούρας, την στιγμή όπου πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία κυμαινόταν μεταξύ 21,5 °C και 23,7 °C. Με βάση τα παραπάνω στοιχεία, αποδεικνύεται ότι η θερμοκρασία του νερού την στιγμή της δειγματοληψίας, ήταν προσαρμοσμένη κατάλληλα στις θερμοκρασιακές απαιτήσεις της τσιπούρας. Εφόσον τα άτομα προήλθαν από τον ίδιο ιχθυοκλωβό, η θερμοκρασία ήταν σταθερή, παρόλα αυτά δεν γνωρίζουμε αν τα άτομα κατά την διάρκεια της ζωής τους υπέστησαν θερμοκρασιακό στρες το οποίο να οδήγησε στην δημιουργία της σκελετικής δυσμορφίας της σκολίωσης. Με περισσότερες δειγματοληψίες στους ιχθυοκλωβούς όπου συλλέχθηκαν τα ψάρια θα υπήρχε μια πιο σαφής ένδειξη σχετικά με την θερμοκρασία του νερού και θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε με περισσότερη βεβαιότητα αν η σκολίωση οφείλεται ή όχι στην τιμή της θερμοκρασίας, καθώς ο ισχυρισμός αυτός θα βασιζόταν σε μεγαλύτερο αριθμό δειγματοληψιών. Η θερμοκρασία του νερού επιδρά άμεσα στην ανάπτυξη των σκελετικών δυσμορφιών στο λαβράκι (Georgakopoulou *et al* 2010). Όσον αφορά τις σκελετικές ανωμαλίες, οι υπάρχουσες μελέτες αποδεικνύουν μία σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας του νερού κατά την πρώιμη οντογένεση όλων των ειδών που εξετάστηκαν μέχρι τώρα.

Στην τσιπούρα, οι Polo *et al* (1991) απέδειξαν ότι η θερμοκρασία του νερού κατά τη διάρκεια των εμβρυϊκών και των λεκιθικών προνυμφικών σταδίων επηρεάζει την ανάπτυξη των σκελετικών παραμορφώσεων. Οι Georgakopoulou *et al* (2010) έδειξαν ότι η θερμοκρασία του νερού επιδρά σημαντικά στην εμφάνιση της αιματικής λόρδωσης και σε παραμορφώσεις του ουραίου και του ραχιαίου πτερυγίου κατά την φάση της μεταμόρφωσης. Αν και η τιμή της θερμοκρασίας στην διάρκεια της επώασης των αυγών των εξεταζόμενων ατόμων δεν είναι γνωστή, φαίνεται ότι η θερμοκρασία η οποία ξεπερνά τους 18 °C στο στάδιο της επώασης των αυγών οδηγεί σε ανωμαλίες της σπονδυλικής στήλης στο είδος *Solea senegalesis* (Dionisio *et al* 2012). Η ύπαρξη υψηλής ποσότητας σεληνίου στο νερό προκάλεσε σκολίωση στο είδος *Poecilia reticulata* (Yang *et al* 2010).

Σύμφωνα με τους Afonso *et al.* (2009) η παρουσία των παραμορφώσεων της σπονδυλικής στήλης και συγκεκριμένα η εμφάνιση της λόρδωσης, σε εκτρεφόμενες τσιπούρες, σχετίζεται με την ύπαρξη της αιμομιξίας. Από τους Teve *et al.* (1982) ερευνήθηκαν οι δυσμορφίες του είδους *Tilapia aurea* οι οποίες οφείλονταν στη ύπαρξη ενδογαμίας του πληθυσμού. Για παράδειγμα μία γενιά ζευγαριών αδελφού-αδελφής (συγγένεια = 25%), αύξησε το ποσοστό της παραμορφωμένης ιριδίζουσας πέστροφας κατά 3% και οι δύο γενιές (συγγένεια = 37%) αύξησαν το ποσοστό κατά 10% (Kincaid 1976). Ο κύριος γενετικός παράγοντας είναι η ύπαρξη υπολλειπόμενων αλληλόμορφων γονιδίων. Οι έρευνες σχετικά με την επιρροή της αιμομιξίας (ή ενδογαμίας) σε ψάρια όπως η ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) (Aulstad και Kittelson 1971), ζέβρα *Danio rerio* (Piron 1978) κ.ά. Επιπλέον, οι Navarro *et al.* (2009) παραθέτουν την κληρονομικότητα ως βασική αιτία της εμφάνισης της λόρδωσης σε ιχθύδια τσιπούρας, ενώ μία ασθενής συσχέτιση μεταξύ των ανωμαλιών του σκελετού και της αιμομιξίας στην τσιπούρα αναφέρθηκε από τους Astorga *et al*

(2003). Τέλος, οι Sadler *et al* (2001) έδειξαν ότι οι διάφορες σκελετικές παραμορφώσεις στο σολομό του Ατλαντικού δεν σχετίζονται και δεν επηρεάζονται από το φύλο των ατόμων αλλά η οποιαδήποτε παρατηρούμενη σκελετική δυσμορφία είναι γενετικής προέλευσης. Σύμφωνα με τα παραπάνω, και λαμβάνοντας υπόψη ότι οι τιμές της θερμοκρασίας του νερού και του διαλυμένου οξυγόνου ήταν κοινές και στις δύο εξεταζόμενες ομάδες, καθώς και ότι όλα τα άτομα σιτίστηκαν με το ίδιο σιτηρέσιο, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα η εμφάνιση της σκολίωσης να οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες.

Σε αυτή την μελέτη, η σκελετική δυσμορφία της σκολίωσης παρατηρήθηκε στην ουραία περιοχή της σπονδυλικής στήλης μεταξύ του 17^{ου} και του 23^{ου} σπονδύλου. Συγκεκριμένα, πιο συχνά παρατηρήθηκε στον 21^ο σπόνδυλο ενώ σε ένα ψάρι παρατηρήθηκε στον 17^ο σπόνδυλο και σε ένα ακόμη στον 23^ο σπόνδυλο. Σύμφωνα με τους Afonso *et al.* (2000) η σκελετική δυσμορφία της σκολίωσης στην τσιπούρα εμφανίστηκε κυρίως μεταξύ του 19^{ου} και του 22^{ου} σπονδύλου. Οι λόγοι οι οποίοι συμβάλλουν στην παρουσίαση της σκολίωσης στην ουραία περιοχή της σπονδυλικής στήλης στα άτομα της τσιπούρας σχετίζονται με την έντονη μυική δραστηριότητα του ουραίου πτερυγίου κατά την προσπάθεια κολύμβησης των ατόμων. Συγκεκριμένα, η ταχύτητα του ψαριού και η αυξημένη μυική δραστηριότητα, η οποία οφείλεται στην εμφάνιση σκελετικών δυσμορφιών, επηρεάζει τους ουραίους σπονδύλους με αποτέλεσμα την μετατόπιση της θέσης τους (Kihara *et al*, 2002).

Το μήκος των αυχενικών σπονδύλων δεν διέφερε μεταξύ των φυσιολογικών και των σκελετικά δύσμορφων ατόμων, καθώς η σκελετική δυσμορφία της σκολίωσης δεν έλαβε χώρα σε κανέναν αυχενικό σπόνδυλο. Η παραπάνω παρατήρηση ήταν αναμενόμενη, καθώς η σκελετική δυσμορφία της σκολίωσης δεν παρουσιάστηκε σε κανέναν αυχενικό σπόνδυλο. Σύμφωνα με τους Berillhs *et al* (2015) η ύπαρξη της

σκελετικής δυσμορφίας της σκολίωσης στους ραχιαίους σπονδύλους της τσιπούρας δεν επηρέασε το μήκος των αυχενικών σπονδύλων. Αντίθετα, στην ραχιαία περιοχή τα μήκη μεταξύ των φυσιολογικών και των σκελετικά δύσμορφων ατόμων διέφεραν στατιστικά σημαντικά αν και η σκολίωση δεν παρατηρήθηκε στους ραχιαίους σπονδύλους. Το παραπάνω αποτέλεσμα πιθανόν να οφείλεται στην ύπαρξη και άλλων σκελετικών δυσμορφιών στα εξεταζόμενα άτομα. Επίσης, η διαφορά των μηκών των ουραίων σπονδύλων διέφερε ανάμεσα στις δύο εξεταζόμενες ομάδες. Στην περίπτωση αυτή η διαφορά μπορεί να εξηγηθεί αφού η σκελετική δυσμορφία της σκολίωσης παρατηρήθηκε μόνο σε ουραίους σπονδύλους. Με βάση τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι αλλάζει η θέση της σπονδυλικής στήλης των σκολιωμένων ατόμων και ταυτόχρονα αλλάζει και το μήκος αυτής. Η ίδια διαδικασία μέτρησης του μήκους των σπονδύλων για την κάθε περιοχή της σπονδυλικής στήλης σε ενήλικα άτομα τσιπούρας ακολουθήθηκε από τους Berillis *et al* (2015) όπου το μήκος των σπονδύλων δεν διέφερε σε καμία περιοχή της σπονδυλικής στήλης μεταξύ των φυσιολογικών και των λорδωμένων ατόμων.

Το ασβέστιο και ο φώσφορος σχετίζονται με την ανάπτυξη του σκελετικού συστήματος και η σταθερότητα των σπονδύλων διατηρείται από την στέρεα φάση του φωσφορικού ασβεστίου. Η περιεκτικότητα σε ανόργανα άλατα των οστών μπορεί να μετρηθεί με πολλές τεχνικές όπως φασματοσκοπία ηλεκτρονίων, EDS και με υψηλής ροής φωτονίων δέσμεων ακτίνων-X (Tzaflidou *et al* 2005). Τα ψάρια όπως και άλλοι υδρόβιοι οργανισμοί απορροφούν Ca και P απευθείας από το νερό (Lall & Lewis-McCrea 2007) πέραν της πρόσληψης τους απευθείας από την τροφή. Το ποσοστό Ca και P σε αποτεφρωμένους σπόνδυλους ατόμων με λόρδωση και ατόμων χωρίς σκελετικές δυσμορφίες, δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές στην τσιπούρα, (Berillis & Panagiotopoulos 2015). Οι Berillis *et al.* (2015) έδειξαν ότι οι σκελετικές

ανωμαλίες σε ενήλικα άτομα τσιπούρας δεν σχετίζονται με το ποσοστό του Ca και P της σπονδυλικής στήλης αλλά πιθανώς με ανωμαλίες στα ινίδια κολλαγόνου. Η σχέση μεταξύ του κολλαγόνου και του υδροξυαπατίτη είναι σημαντική για την ανθεκτικότητα και την σκληρότητα των οστών (Mahamid *et al* 2008). Η διατροφή είναι η κύρια πηγή φωσφόρου, διότι η συγκέντρωση του φωσφόρου είναι χαμηλή στο θαλασσινό νερό (Lall και Lewis-McCrea 2007). Η ανεπάρκεια του ασβεστίου δεν υφίσταται συχνά στα ψάρια, αντίθετα η ανεπάρκεια του φωσφόρου οδηγεί στην μειωμένη ανάπτυξη του ατόμου, στην μειωμένη ανοργανοποίηση των οστών και τέλος στην δημιουργία σκελετικών ανωμαλιών (Lall 2002). Η αναλογία Ca / P σε ολόκληρο το σώμα των διαφόρων ειδών ψαριών κυμαίνεται από 0,7 έως 1,6 (Lall 2002). Οι Ozawa και Suzuki (2002) έδειξαν ότι το ποσοστό Ca/P στην τσιπούρα ήταν 2,02 τιμή η οποία είναι κοντά στα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, καθώς η αναλογία Ca/P για φυσιολογικά άτομα ήταν $1,72 \pm 0,15$ ενώ για τα σκολιωμένα ήταν $1,76 \pm 0,16$.

Η παρούσα εργασία απέδειξε ότι υπάρχει διαφορά στα μήκη των σπονδύλων μεταξύ των σκολιωμένων και των φυσιολογικών ατόμων, συνεπώς η θέση της σπονδυλικής στήλης αλλάζει με την παρουσία της σκολίωσης. Η σκολίωση δεν επηρεάζει το ποσοστό του ανόργανου και του οργανικού υλικού ούτε και το ποσοστό των ανόργανων στοιχείων μεταξύ των δυο καθορισμένων ομάδων. Σύμφωνα με τους Berillhs *et al* (2015), το ποσοστό του ανόργανου υλικού δεν επηρεάστηκε από την παρουσίαση της λόρδωσης σε ενήλικα άτομα τσιπούρας. Η μοναδική διαφορά παρατηρήθηκε στο χημικό στοιχείο κάλιο όπου το ποσοστό του ήταν σημαντικά μειωμένο στα σκολιωμένα άτομα. Οι λόγοι εμφάνισης της σκολίωσης καθώς και επιρροή αυτής στα ανόργανα στοιχεία και γενικότερα στα συστατικά των σπονδύλων δεν είναι γνωστοί. Έχει αποδειχθεί ότι το ποσοστό Ca και P στους σπονδύλους

εκτρεφόμενων τσιπούρων δεν διέφερε μεταξύ των σκελετικά δύσμορφων και των φυσιολογικών ατόμων (Berillhs *et al* 2015). Περαιτέρω έρευνα, κυρίως στα σκολιωμένα νεαρά άτομα, με πλήρη γνώση του ερευνητή των συνθηκών εκτροφής, όπως τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού, η σύσταση της χορηγούμενης τροφής κ.ά. τόσο κατά την διάρκεια της εκκόλαψης, όσο και των μετέπειτα σταδίων θα μπορούσε να προσδιορίσουν τους λόγους παρουσίας της σκολίωσης. Καταλήγοντας, είναι επιτακτική η ανάγκη ύπαρξης περισσότερων ερευνών ώστε μελλοντικά να μπορέσουν να προσδιοριστούν οι λόγοι εμφάνισης της σκολίωσης για μπορούν να εφαρμοστούν τα κατάλληλα προληπτικά μέτρα. Οι μελλοντικοί πειραματισμοί θα πρέπει να επικεντρωθούν στη μελέτη της επίδρασης των γνωστών παραγόντων που επιφέρουν δυσμορφίες μέσω πειραματικών εκτροφών ώστε να προσδιοριστούν τα αίτια εμφάνισης των σκελετικών δυσμορφιών.

Η παρούσα εργασία απέδειξε ότι τα ποσοστά των χημικών στοιχείων, του οργανικού και του ανόργανου υλικού των οστών, των σκολιωμένων τσιπυρών δεν επηρεάζονται από την εμφάνιση της σκολίωσης. Επιπλέον, έδειξε ότι το μήκος των σπονδύλων επηρεάζεται από την παρουσία της σκολίωσης κυρίως στην ουραία περιοχή η οποία αποτελεί την κυριότερη περιοχή εμφάνισης της σκολίωσης. Περαιτέρω έρευνες, σε ενήλικα άτομα τσιπούρας, θα μπορούσαν να προσδιορίσουν τους ακριβείς μηχανισμούς, οι οποίοι επηρεάζουν το μήκος των σπονδύλων στα σκολιωμένα άτομα. Τέλος, περισσότερες μελέτες θα πρέπει να επικεντρωθούν στην επίδραση των παραγόντων που επιφέρουν την σκελετική δυσμορφία της σκολίωσης, σε σχέση με την επιρροή αυτών στους σπονδύλους των σκολιωμένων ατόμων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Afonso JM, Astorga N, Navarro A, Montero D, Zamorano MJ, Izquierdo M. (2009) *Genetic determination of skeletal deformities in gilthead seabream (Sparus aurata L.). In: IAFSB 2009 Book of abstracts, Communication Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology, Tavira, Algarve, Portugal, 90*

Afonso J.M., Montero D., Robaina L., Astorga N., Izquierdo M.S., Gines R. (2000) Association of a lordosis-scoliosis- kyphosis deformity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) with family structure. Fish Physiology and Biochemistry, 22 (2):159-163

Andrades J.A, Becerra J., Fernandez-Liebrez P. (1996) Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 141 (1-2):1-11

Aulstad D, Kittelsen A. (1971) Abnormal body curvatures of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) inbred fry. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 28: 1918-1920

Backiel T, Kokurewicz B, Ogorzalek A (1984) High incidence of skeletal anomalies in carp, *Cyprinus carpio*, reared in cages in flowing water. *Aquaculture* 43(4), 369-380

Bengtsson B.E., Coombs T.L., Waldichuk M. (1979) Biological Variables, Especially Skeletal Deformities in Fish, for Monitoring Marine Pollution. The Royal Society, 286, 1015

Berillis P., Panagiotopoulos N., (2015α), Ca, P and Collagen Fibrils Period

Measurements in the Vertebrae of Lordotic *Sparus aurata*. *2nd International Multidisciplinary Microscopy and Microanalysis Congress*. of Springer Proceedings In Physics, (164) 217-222

Berillis P., Panagiotopoulos N., Boursiaki V., Karapanagiotidis T.I., Mente E. (2015 β) Vertebrae length and ultra-structure measurements of collagen fibrils and mineral content in the vertebrae of lordotic gilthead seabreams (*Sparus aurata*). *Micron* 75:27-33

Boglione, C., Gisbert, E., Gavaia, P., Witten, E., Moren, P., Fontagné, M., Koumoundouros, S.G. (2013 α) Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. *Rev. Aquac.* 5,

Boglione, C., Costa, C., 2011. Skeletal deformities and juvenile quality. In: Pavlidis, M., Mylonas, C. (Eds.), *Sparidae: Biology, Aquaculture of Gilthead Sea Bream, Other Species*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 233–294.

Boglione C, Gagliardi F, Scardi M, Cataudella S. (2001) Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Aquaculture*, 192 (1):1-22

Boglione, C., Gavaia, P., Koumoundouros, G., Gisbert, E., Moren, M., Fontagné, S., Witten, P.E. (2013 β) A review on skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 1: normal and anomalous skeletogenic processes. *Rev. Aquac.* 5, 99–120.

Cahu C., Jambonino-Infante J., Takeuchi T. (2003 β) Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae, *Aquaculture*, 227, 245-258

Cahu C., Zambonino Infante L. J. and Barbosa V. (2003 α) Effect of dietary phospholipid level and phospholipid: neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. *B J N* 90: 21-28.

Cahu CL, Zambonino-Infante JL, Quazuguel P, Le Gall MM. (1999) Protein hydrolysate vs fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*, 171: 109–119

Caris, M.G. and Rice, S.D., 1990. Abnormal development and growth reductions of pollock *Therugra chulcogramma* embryos exposed to water-soluble fractions of oil. *Fish. Bull. US*, 88: 29-37.

Carvalho AP, Escaffre A-M, Oliva-Teles A, Bergot P. (1997) First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. *Aquaculture*, 5: 361–367

Castro J., Pino-Querido A., Hermida M., Chavarrias D., Romero R., Garcia-Cortes A.L., Toro A.M., Martinez P. (2008) Heritability of skeleton abnormalities (lordosis, lack of operculum) in gilthead seabream (*Sparus aurata*) supported by microsatellite family data. *Aquaculture*, 279 (1-4):18-22

Chatain, B., 1989. Problems related to the lack of swimbladder in intensive rearing of *Dicentrarchus labrax* et *Sparus auratus*. In: Advances in tropical aquaculture, Tahiti, Feb. 20-March 4, 1989. Aquacop. IFRE- MER. Actes de colloque, 9, 699-709.

Chatain, B. (1994) Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus auratus*). *Aquaculture*, 119 (4):371–379..

Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M.R., Bergot, P. & Sorgeloos, P. (1997) Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture*, 155, 1–4

Daoulas, C.H., Economou, N.A., Bantavas, I., 1991. Osteological abnormalities in laboratory reared sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fingerlings. *Aquaculture* 97, 169–180

Darias M.J, Mazurais D, Koumoundouros G, Glynatsi N, Christodouloupoulou S, Huelvan C, Desbruyeres E, Le Gamm M.M, Quazuguel P, Cahu C.I, Zambonino-Infante J.L (2010) Dietary vitamin D₃ affects digestive system ontogenesis and ossification European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.1758) *Aquaculture* 298, 300-307

DeLuca H.F (2004) Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Acu.J.Clin. Nutr.* 80,1689-1696

Divanach P., Papandroulakis N., Anastasiadis P., Koumoundouros G., Kentouri M.

(1996) Effect of water currents on the development of skeletal deformities in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) with functional swimbladder during postlarval and nursery phase. *Aquaculture*, 156 (1-2), 145-155

Estevao M.D., Redruello B., Canario A.V.M., Power D.M. (2005) Ontogeny of osteonectin expression in embryos and larvae of sea bream (*Sparus auratus*). *General and comparative endocrinology*, 142 (1-2), 155-162

Faustino M., Power M.D. (1998) Development of osteological structures in the sea bream: vertebral column and caudal fin complex. *Journal of fish biology*, 52, 11-22

Fernandez I., Hontoria F., Ortiz-Delgado B.J., Kotzamanis Y., Estevez a., Zambonino-Infante J.L., Gisbert E. (2008) Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture*, 283 (1-4): 102-115

Gapasin R.S.J, Duray M.N, (2001) Effects of DHA-enriched live food on growth, survival and incidence of opercular deformities in milkfish (*Chanos chanos*). *Aquaculture* 193,49-63

Gjerde B, Pante M.J.R, Baeverfjord G. (2005) Genetic variation for a vertebral deformity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 244 (1-4), 77-87

Georgakopoulou E., Katharios P., Divanach, P., Koumoundouros, G. (2010) Effect of temperature on the development of skeletal deformities in gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 308(1-5): 13–19

Geurden, I., Raduenz-Neto, J. & Bergot, P. (1995) Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture*, 131, 303–314

Gisbert E, Skalli A, Fernández I, Kotzamanis Y, Zambonino-Infante JL, Fabregat R. (2012) Protein hydrolysates from yeast and pig blood as alternative raw materials in microdiets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 338: 96–104

Grotmol S, Kryvi H, Totland GK. (2005) Deformation of the notochord by pressure from the swim bladder may cause malformation of the vertebral column in cultured Atlantic cod

Haya, K., 1989. Toxicity of pyrethroid insecticides to fish. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8: 381-391. Hinton

Hinton, D.E., Baumann, P.C., Gardner, G.R., Hawkins, W.E., Hendricks, JD., Murchelano, R.A. and Okihiro, M.S. 1992. Histopathological biomarkers. In: *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Antropogenic Stress*. pp. 155–209. Edited by R.J. Hugget, R.A. Kimerle, P.M. Mehrle and H. Bergman. Lewis, Boca Raton

Hough C (2009) Improving the sustainability of European fish aquaculture by the control of malformations. In: *FINFISH Final Workshop 5th Fish & Shellfish Larviculture Symposium*. Ghent University, Belgium

Kentouri, M., 1985. Comportement larvaire de 4 sparides Meditteraneens en elevage *S. aurata*, *Diplodus*, *Z.sargus*, *Lithognathus mormyrus* et *Puntazzo puntazzo* Poissons Teleosteens . These D'etat, Univ. Sci ` Technol. Languedoc, Montpellier.

Kihara M., Ogata S., Kawano N., Kubota I., Yamaguchi R. (2002) Lordosis induction in juvenile red sea bream, *Pagrus major*, by high swimming activity. *Aquaculture*, 212 (1-4):149-158

Kincaid HL (1976) Inbreeding in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Fish Res Board Can* 33, 2420-2426

Koumoundouros, G., 2010. Morpho-anatomical abnormalities in Mediterranean marine aquaculture. In: Koumoundouros, G. (Ed.), *Recent Advances in Aquaculture Research*. Transworld Research Network, Kerala, India, pp. 125–148.

Koumoundouros G, Divanach P, Savaki A, Kentouri M. (1997) The opercular complex deformity intensive gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) Larviculture. Moment apparition and description. *Aquaculture* 156, 165-177

Liebrez P. (1996) Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 141 (1-2), 1-11

Lim, C., Lowell, R.T., 1978. Pathology of the vitamin C syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal of Nutrition*, 108, 1137–1146.

Lom, J., Pike, A.W., Dykova, I., 1991. *Myxobolus sandrae* (Reuss, 1906), the agent of

vertebral column deformities of perch *Perca fluviatilis* in northeast Scotland. Dis. Aquat. Org. 12, 49-53.

Mair G.C. (1992) Caudal deformity syndrome (CDS): an autosomal recessive lethal mutation in the tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Journal of fish diseases, 15: 71-75

Mazurais D, Glynatsi N, Darias M.J, Christodouloupoulou S, Cahu C.I, Zambonino-Infante J.I, Koumoundouros G (2009) Optimal levels of dietary vitamin A for reduced deformity incidence during development of European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) depend on malformation type. Aquaculture 294, 262-270

Nacario, J.F. (1983) The effect of thyroxine on the larvae and fry of *Sarotherodon niloticus* (*Tilapia nilotica*). Aquaculture, 34 (1-2):73–83.

Navarro A, Zamorano MJ, Hildebrandt S, Ginés R, Aguilera C, Afonso JM. (2009) Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and carcass traits in gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), under industrial conditions. Aquaculture, 289: 225–230.

Polo A, Yúfera M, Pascual E. (1991) Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata* L. Aquaculture, 92: 367–375.

Roo F.J., Hernandez-Cruz C.M., Saccoro J.A., Fernandez-Palacios H., Montero D., Izquierdo M.S. (2009) Effect of DHA content in rotifers on the occurrence of skeletal deformities in red porgy *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758). Aquaculture, 287 (1-2), 84-

Santamaria J.A, Andrades J.A, Herraes P, Fernández-Llebrez P, Beccera J, (1994). Perinotochordal connective sheet of gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*, L.) affected by axial malformations: An histochemical and immunocytochemical study. The Anatomical Record, 240 (2), 248-254

Sadler J., Panhurst P.M., King H.R. (2001) High prevalence of skeletal deformity and reduced gill surface area in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 198 (3-4), 369-386

Sfakianakis D.J, Koumoundouros G, Divanach P, Kentouri M, (2004) Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L.1758) Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities. Aquaculture 232,407-424

Sfakianakis D.J, Georgakopoulou E, Papadakis I.E, Divanach P, Kentouri M, Koumoundouros G (2006) Environmental determinants of heamal lordosis in European sea bass *Dientrarchus labrax* (L.1758). Aquaculture 254, 54-64

Sutton A.L, Zhang X, Fllioson T.I, Macdonald P.N, (2005) The 1,25 (OH)₂ D₃-regulated transcription factor MN1 stimulates vitamin D receptor-mediated transcription and inhibits osteoblastic cell proliferation. Mol. Endocrinol. 19, 2234-2244

Tave D, Bartels J.E, Smitherman R.O (1982) Stumpbody *Sarotherodon*

aureus (Steindachner) (= *Tilapia aurea*) and tail-less *S. niloticus* (L.) (= *T. nilotica*): two vertebral anomalies and their effects on body length. *Journal of Fish Diseases* 5,487-494

Tzaphlidou, M., 2005. The role of collagen in bone structure: an image processing approach. *Micron* 36, 593–601

Yang Z, Yang X, Chen J, Zhang D, Yang C, Li M (2010) High selenium may be a risk factor of adolescent idiopathic scoliosis. *Medical Hypotheses*.75, 126-127

Villeneuve V, Gisbert E, Moriceaou J, Cahu C.I, Zambonino-Infante J.L (2006) Intake of high levels of vitamin A and polyunsaturated fatty acids during different developmental periods modifies the expression of morphogenesis genes in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) *Br. J. Nutr.* 93, 1-12

Villeneuve V, Gisbert E, Le Delliou H, Cahu C.I, Zambonino-Infante J.L (2005) Dietary levels of all-trans retinol affect retinoid nuclear expression and skeletal development in European sea bass larvae. *Br. J. Nutr.* 93, 1-12

Witten P.E. (2013b) A review on skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 1: normal and anomalous skeletogenic processes. *Rev. Aquac.* 5, 99–120

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Κουσουλάκος Σ. (2007) Εισαγωγή στην αναπτυξιακή βιολογία και ιστολογία.

Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα, 198-203

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

<https://www.fgm.com.gr> (5/10/2017)

6. ABSTRACT

Gilthead seabream (*Sparus aurata*) is one of the most important farmed fish species in the Mediterranean region. Skeletal deformities are a major factor that affects the external morphology, growth and survival of farmed fish as well as the production cost of the aquaculture operation. The development of skeletal disorders is not well understood, but it is considered to be related to nutritional, environmental and genetic factors. In this study a sample of 20 individual sea breams were collected from a nearby fish farm and divided into two groups. The first group included fish without skeletal deformities, while the second group consisted of fish with the skeletal deformity of scoliosis. The total length and weight of every single individual fish of the sample was measured and then radiographed. The vertebral column of all individuals was divided into three main regions: cervical, abdominal and caudal region. Afterwards, the length of each vertebra for both the normal and deformed skeletal fish was measured. As a result of the statistical process of all the above collected data, it was found that no significant difference existed between the distances of each vertebra of the two examined groups. In addition, the inorganic and organic bone material rates were measured. Then the EDS method determined the percentage of each bone mineral element. The percentages of both organic and inorganic material did not differ statistically from normal and scarce individuals. Finally, the percentages of Ca, P, Na, Mg, Cl, Ir, Cu did not differ significantly between the two groups of fish. On the contrary, the percentage of K differed significantly between normal and scarred individuals.

Keywords: *Sparus aurata*, scoliosis, EDS, organic material, inorganic material